

**Die neuroprotektive Wirkung der NMDA-Rezeptorantagonisten  
CGS, Memantin und Ifenprodil, sowie Roscovitin und NMDA  
auf die hypoxiebedingte Zellschädigung an  
embryonalen kortikalen Zellen von Ratten**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Johanna Verena Gisela Holtkamp, geb. von Puttkamer  
geboren am 26.05.1981  
in Hannover

angefertigt an der: Universität Leipzig  
Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
(Direktor: Prof. Dr. Michael Schaefer)

Betreuer: Prof. Dr. Clemens Allgaier  
Mitbetreuer: Dr. Susana Garcia de Arriba

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.02.2015

## INHALTSVERZEICHNIS

Bibliographische Beschreibung.....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Schlaganfall.....	1
1.2 Der Zelltod: Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose .....	2
1.3 Cykline- abhängige Kinase 5: Roscovitin.....	3
1.4 Der NMDA-Rezeptor.....	6
1.4.1 Struktur und Eigenschaften.....	6
1.4.2 NMDA-Rezeptoragonist und -antagonisten .....	7
1.5 Aufgaben- und Zielstellung .....	10
2 Materialien und Methoden.....	11
2.1 Materialien .....	11
2.1.1 Zellkulturmedium, Chemikalien, Reagentien.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	12
2.2 Methoden .....	14
2.2.1 Kultivierung kortikaler Neurone.....	14
2.2.2 Hypoxie-Modell.....	15
2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität mit der LDH-Methode.....	16
2.2.4 Analyse der Bildung freier Sauerstoffradikale .....	18
2.2.5 Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität.....	20
2.2.6 Fluorimetrische Messung .....	20
2.2.7 Proteinbestimmung .....	21
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Bestimmung der Zellviabilität mit der LDH-Methode .....	23
3.1.1 LDH-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung .....	24
3.1.2 Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin auf die hypoxiebedingte Schädigung.....	24
3.1.3 Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil auf die hypoxiebedingte Schädigung.....	25
3.1.4 Einfluss von Roscovitin, MK-801 und CGS auf die hypoxiebedingte Schädigung .....	26
3.1.5 Einfluss von NMDA auf die hypoxiebedingte Schädigung .....	27
3.2 Bildung der freien Sauerstoffradikale (ROS).....	29
3.2.1 Einfluss des NMDA-Rezeptoragonisten und der -antagonisten Memantin und Ifenprodil auf die ROS-Bildung .....	29
3.3 Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität.....	31
3.3.1 Einfluss des Caspase-Inhibitors DEVD auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung .....	31
3.3.2 Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin auf die Caspase- Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung.....	32
3.3.3 Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil auf die Caspase- Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung.....	33
3.3.4 Einfluss von NMDA auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung .....	34
4 Diskussion .....	35
5 Zusammenfassung der Arbeit.....	41

6	Literatur .....	44
7	Anhang.....	50
7.1	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit .....	50
7.2	Lebenslauf.....	51
7.3	Danksagung.....	52

## Bibliographische Beschreibung

**Name:** Holtkamp, Johanna Verena Gisela

**Titel der Arbeit:** Die neuroprotektive Wirkung der NMDA-Rezeptorantagonisten CGS, Memantin und Ifenprodil, sowie Roscovitin und NMDA auf die hypoxiebedingte Zellschädigung an embryonalen kortikalen Zellen von Ratten

**Universität Leipzig, Dissertation**

58 S., 65 Lit., 23 Abb., 1 Tab.

**Referat:** Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der NMDA-Rezeptorantagonisten, Memantin, MK-801, CGS und Ifenprodil, sowie subtoxischer Konzentrationen von NMDA und von Roscovitin, einem Hemmer Cyclin-abhängiger Kinasen, auf die hypoxieinduzierte Zellschädigung an kortikalen Zellen der Ratte. Ziel dieser Arbeit war es, die neuroprotektive Wirkung dieser Substanzen zu erfassen. Zur Beurteilung der Zellschädigung wurden der Anstieg der LDH-Aktivität, die Freisetzung freier Sauerstoffradikale und die Steigerung der Caspase-3-Aktivität bestimmt. Dabei wurde der LDH-Test zur Bestimmung der LDH-Aktivität verwendet, für die Freisetzung der Sauerstoffradikale diente die DCF-Fluoreszenz, dessen Emission den intrazellulären Sauerstoffmetabolismus widerspiegelt, und die Caspase-3-Aktivität wurde mittels eines Fluorimeters gemessen. Während die Bestimmung der LDH-Aktivität und die Freisetzung der freien Sauerstoffradikale nekrotische Veränderungen der Zellen charakterisiert, zeigt eine Zunahme der Caspase-Aktivität apoptotische Vorgänge an. Die Ergebnisse des LDH-Tests zeigen, dass MK-801, Memantin, Roscovitin und insbesondere NMDA die LDH-Aktivität signifikant vermindern und somit einen protektiven Effekt auf die Zellen ausüben. Darüber hinaus reduzieren Ifenprodil, Memantin und NMDA signifikant die Freisetzung der freien Sauerstoffradikale. Einen protektiven Effekt auf die Zellschädigung zeigen Memantin und NMDA auch in Bezug auf die Beeinflussung der Caspase-3-Aktivität. Demgegenüber weist CGS in den Versuchen keinen protektiven Einfluss auf die hypoxieinduzierte Zellschädigung nach. Diese Arbeit zeigt, dass die Applikation niedriger NMDA-Konzentrationen neuroprotektive Effekte auf die Entwicklung der hypoxischen Schädigung von kortikalen Zellen der Ratte hat. NMDA scheint sogar denselben, wenn nicht sogar einen größeren protektiven Effekt wie Memantin zu induzieren.

## Abkürzungsverzeichnis

*	signifikant gegenüber der Normoxie-Kontrolle
#	signifikant gegenüber der Hypoxie-Kontrolle
°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
AMPA-Rezeptor	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionac-Rezeptor
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (neuronaler Wachstumsfaktor)
BSA	Rinder-Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CDK	cyclinabhängige Kinase (Cyclin-Dependent Kinase)
CGS19755	cis-4-(Phosphonomethyl)-piperidine-2-carboxylic acid
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CU <sup>2+</sup>	Kupferion
DEVD	Caspase-Inhibitor
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FKS	Fötales Kälberserum
FW	Formula Weight = molare Masse
g	Gramm
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (Hank's Balanced Salt Solution)
HEPES	(N-2-Hydrxyethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulfonsäure)
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDH	Laktat-Dehydrogenase

Mem.	Memantine hydrochloride
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
min	Minute
MK	Molekulargewicht (Molecular Weight)
MK-801 hydrogen maleate	(5R,10S)-(+)-5-Methyl-10,11-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogene maleate
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonuclein Acid
mV	Millivolt
NAD <sup>+</sup>	oxidierte Form von (NAD) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form von (NAD) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
nm	Nanometer
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
pH	pondus hydrogenii
ROS	freie Sauerstoffradikale
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
S.E.M.	Standard Error of Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
vs.	versus

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Schlaganfall

Der Schlaganfall liegt in der Todesursachenstatistik auf Platz 3, nach koronarer Herzkrankheit (KHK) und Malignomen, und ist eine der häufigsten Ursachen für neurodegenerative Erkrankungen. Von den Überlebenden wird ein Drittel wiederhergestellt, ein Drittel bleibt pflegebedürftig und ein Drittel haben Einschränkungen im Alltagsleben; somit gehört er zu den häufigsten Ursachen für Invalidität im höheren Lebensalter. Die Inzidenz beträgt im Alter von 55-64 Lebensjahren 300/100.000/Jahr und im Alter von 65-74 Jahren 800/100.000/Jahr. Männer erkranken generell häufiger als Frauen (Herold, 2006). Ca. 80% der Schlaganfälle beruhen auf einer zerebralen Hypoxie durch den Verschluss der Arteria cerebri media (mittleren Hirnarterie) (Fink, 2005).

Die akute Behandlung des hypoxischen Schlaganfalls besteht in (Herold, 2006; Fink, 2005; Ringleb et al., 2001):

- a. Allgemeinmaßnahmen: Sicherung der Vitalfunktionen, Elektrolytausgleich, gute Sauerstoffsättigung, langsame Senkung extrem erhöhter Blutdruckwerte (schonend und nicht mehr als 20% gegenüber dem Ausgangswert), Senkung erhöhter Blutzuckerwerte und aggressive Senkung der erhöhten Körpertemperatur.
- b. Revaskularisierung: Das Zeitfenster für eine wesentliche rekanalisierende Therapie ist klein und beschränkt sich, laut aktuellen Schlaganfallstudien ECASS 3 und SITS-ISTR, auf 3 bis 4,5 Stunden nach Insultbeginn (Hacke, 2008; Wahlgren, 2008). Das Mittel der Wahl ist der rekombinante Gewebeplasminogenaktivator (rtPA). Sein Wirkmechanismus beruht auf der Beschleunigung der endogenen Thrombolyse durch Aktivierung des fbringeunden Plasminogens.
- c. rtPA (Alteplase, z. B. Acitlyse®) 0,9 mg/kg KG i.v., 10% als Bolus, 90% der Dosis über 1 h
- d. Antikoagulation mit Heparin bei Hirnembolien. Als Standard ist die Heparinisierung wegen der häufigen Blutungskomplikationen nicht geeignet.
- e. Rehabilitation

## 1.2 Der Zelltod: Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose

Der programmierte Zelltod und die koordinierte Zellteilung sind wesentliche Bestandteile für das reibungslose Funktionieren unseres Körpers.

Bereits 1842 wurde von Vogt der programmierte Zelltod unter physiologischen Bedingungen erwähnt (Ganten, 2008). Doch erst 1972 erschien eine genaue Definition und damit die Differenzierung des Zelltods während der Embryonalentwicklung in Apoptose und Nekrose (Kerr et al., 1972). Apoptosevorgänge gibt es in allen Organen von der Embryonalentwicklung bis hin ins Erwachsenenalter (die Menstruation ist z. B. die Folge einer Apoptoseinduktion).

Die Nekrose (griech. nekros = Leiche) ist ein Vorgang, bei dem es durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel Infektionen mit lytischen Viren, die Aktivierung des Komplementsystems und Nahrungs- und/oder Sauerstoffmangel, zu einer Schädigung und somit zum Absterben der Zelle kommt. In nekrotischen Zellen kommt es zu einem zufälligen, ungeregelten Abbau der DNS, indem die Zellen nach Einstrom von Wasser anschwellen und platzen. Da der gesamte Zellinhalt in das umliegende Gewebe abgegeben wird, kommt es dort zu einer Entzündungsreaktion.

Im Gegensatz zur Nekrose stellt die Apoptose (griech. apo = ab, weg; ptosis = Senkung; beschreibt den Fall welcher Blätter im Herbst) eine kontrollierte, aktive Form des Auflöses der Zelle dar, die unter direkter genetischer Kontrolle steht. Auslöser können genetische (von innen induzierte), biochemische und immunologische (von außen induzierte) Faktoren sein, z. B. bestimmte Cytokine, Viren, Onkogene, Cystein-(SH-)Proteasen, Gamma- oder UV-Strahlen, Sauerstoffmangel und Schädigung der DNS. Bei größeren DNS-Schäden verhindert das Protein p53 die weitere Teilung der Zelle bzw. leitet den Apoptosevorgang ein. Die zuvor genannten Faktoren wirken apoptosefördernd auf bestimmte *Schlüssel-Proteasen*, sogenannte Caspasen (Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteinasen). Die Caspasen aktivieren kaskadenartig proteolytische Spaltungsvorgänge und lösen somit die Apoptose in der Zelle aus (Alnemri, 1997). Es existieren zehn verschiedene inaktive Vorstufen der Caspasen (Procaspasen), die durch andere Caspasen oder autoproteolytisch aktiviert werden. Morphologisch kommt es während der Apoptose zu einer Kondensation des Chromatins, einer Vakuolisierung des Cytoplasmas und zu einer Bildung von Ausstülpungen und Bläschen an der Cytoplasmamembran. Damit die abgetöteten Zellen effizient und ohne die Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen entfernt werden können, werden sie durch das Glykoprotein CD14 an der äußeren Zellmembran von Makrophagen fixiert. Diese Bindung löst die Phagozytose der apoptotischen Zelle aus (Ganten, 2008).



### 1.3 Cykline- abhängige Kinase 5: Roscovitin

Die nach geringen hypoxischen Insulten auftretende fehlerhafte Aktivierung des Zellzyklenmechanismus soll zu der Apoptose beitragen, durch die viele Neurone einen verzögerten Zelltod erleiden. Veränderungen der Zellzyklusregulationsmechanismen sind eine Vorstufe für den verzögerten neuronalen Zelltod bei der fokalen zerebralen Hypoxie, so dass auf Neuroprotektion abzielende pharmakologischen Interventionen sinnvollerweise auf die regulatorischen Mechanismen des Zellzykluses ausgerichtet sein könnten (*Katchanov et al. 2001*).

Die Cyklin-abhängige Kinase 5 (CDK5) wurde in den frühen 1990er Jahren beschrieben (Dhavan und Tsai 2001). Sie ist eine Prolin-gerichtete Kinase, die hohe Sequenzhomologie zu anderen CDK's aufweist, jedoch im Unterschied zu diesen nicht an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist.

CDK5 übt wichtige Funktionen im Überleben und Zelltod eines Neurons aus z.B. Organisation des Zytoskeletts, Endo- und Exocytose, Zelladhäsion und der Regulierung von Signalwegen. (siehe Abbildung 1). Bei Stress zeigen Neurone eine signifikante CDK5-Veränderung. Unter neuropathologischen Bedingungen wurde eine vermehrte Calpain abhängige Spaltung der CDK5-Aktivatorproteine und eine daraus resultierende erhöhte CDK5-Aktivität beobachtet. Neben den Hinweisen, dass eine abnormal erhöhte CDK5-Aktivität die Apoptose begünstigt, gibt es auch Evidenzen, dass CDK5 eine wichtige Funktion im neuronalen Überleben ausübt. Daher ist es denkbar, dass der bevorzugte Effekt von CDK5 bei Stress von Faktoren wie Intensität, Dauer und subzellulärer Lokalisation der CDK5-Aktivität abhängt.

Studien in verschiedenen neuronalen Zelltodmodellen zeigen eine wichtige Funktion von Calpain bei der Aktivierung von CDK5. Dies steht im Einklang zu der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration während der Apoptose. So konnte zum Beispiel eine verstärkte Spaltung der Aktivatorproteine p35 oder p39 in Zellkulturen nach Behandlung mit Ionophoren, Glutaminsäure, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Staurosporin beobachtet werden (Canudas et al. 2004, Lee et al. 2000, Nath et al. 2000, Patzke und Tsai 2002). Eine ebensolche Calpain abhängige Spaltung wurde bei der Hypoxie beobachtet (Lee et al. 2000, Nath et al. 2000, Patzke und Tsai 2002).

In neuronalen Zellkulturen wurde die Apoptose, induziert durch  $\beta$ -Amyloid, Colchicin oder Staurosporin, durch spezifische CDK5-Inhibitoren verhindert (Alvarez et al. 2001, Lee et al. 2000, Weishaupt et al. 2003).

Daher gibt es eine vermehrte Evidenz, dass die Zellzyklen CDKs und CDK5 zur Pathogenese des Schlaganfalles beitragen. Obwohl vielversprechende neuroprotektive Effekte pharmakologischer CDK-Inhibitoren in entsprechenden Tiermodellen nachgewiesen wurden, erreicht keiner dieser Inhibitoren eine klinische Relevanz bei Menschen. Eine systemische Gabe von (S)-Roscovitin, ein bekannter Inhibitor mitotischer CDKs und CDK5, zeigte einen dosisabhängigen neuroprotektiven Effekt in zwei Modellen fokaler Hypoxie. (S)-Roscovitin passiert die Blut-Hirnschranke und ein signifikanter positiver invitro Effekt konnte nachgewiesen werden, wenn die Substanz systematisch zwei Stunden nach dem Insult verabreicht wurde (Menn et al. 2010).

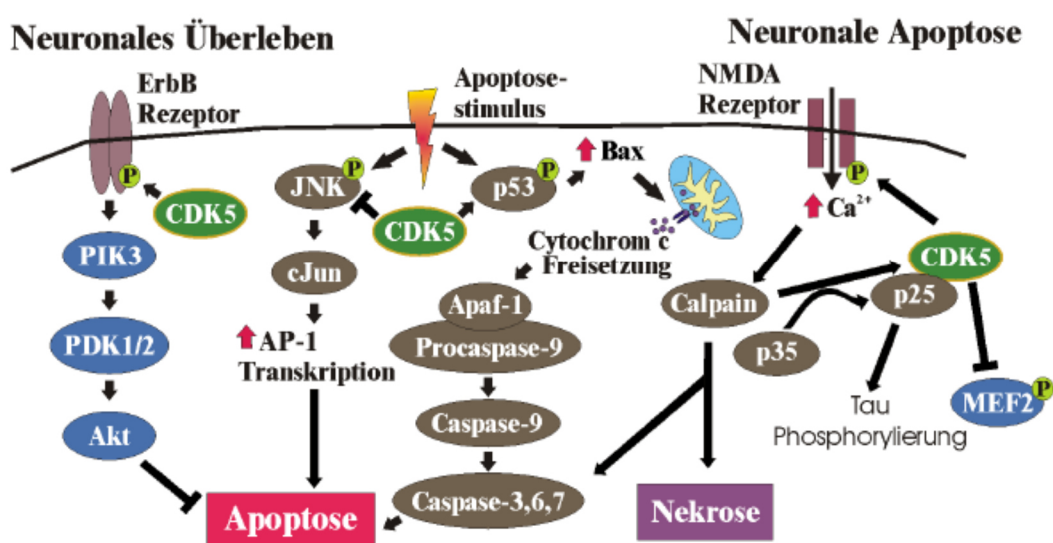


Abbildung 1: Schematische Zusammenfassung zur Wirkweise von CDK5

## Roscovitin

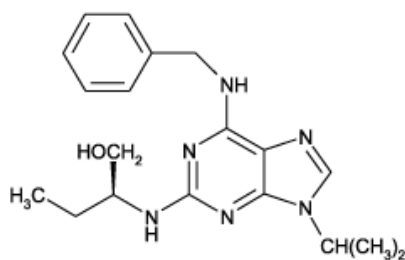


Abbildung 2: Strukturformel von Roscovitin  
([www.axxora.com/natural\\_products\\_ALX-350-251/o...](http://www.axxora.com/natural_products_ALX-350-251/o...))

Roscovitin; ein selektiver Hemmer der Cyclin-abhängigen Kinase CDK5. (R)-Roscovitin ist einer der am häufigsten untersuchten selektiven Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs) (Bach et al., 2005). Es existieren zwei Stereoisomere (R)- und (S)-Roscovitin, wobei das (R)-Isomer etwas wirksamer in Bezug auf die CDKs ist (De Azevedo, 1997) und daher meist für präklinische und klinische Studien verwendet wurde (De la Motte, 2004). Die neurodegenerativen Eigenschaften von Roscovitin konnten anhand zweier Mechanismen erklärt werden, nämlich der Verhinderung der Zellzyklusaktivität und der Inhibition der proapoptotischen Eigenschaften von p25 (Dai und Grant, 2003; Fischer und Gianella-Borradori, 2003; Sausville, 2002; O'Hare et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass CA1-Pyramidenneuronen nach transientser Vorderhirnhypoxie degenerieren, während Neurone anderer Hippocampusregionen intakt blieben. In Hippocampus CA1-Neuronen der Ratte induziert die Vorderhirnhypoxie die Phosphorylierung der NMDA-Rezeptor 2A-Untereinheit bei SER 1232 (Phosphor-SER 1232). SER 1232 Phosphorylierung wird durch CDK5 katalysiert. Die Inhibitoren von endogenem CDK5 oder die Unterbrechung der Interaktion zwischen CDK5- und NR2A-Untereinheiten beseitigt die NR2a-Phosphorylierung bei SER 1232 und schützte CA1-Pyramidenzellen vor dem hypoxischen Insult (Wang et al. 2003). Daher scheint es so, dass die Modulation von NMDA-Rezeptoren durch CDK5 den primären, der hypoxischen Schädigung von CA1-pyramidalen Zellen zugrunde liegenden, intrazellulären Mechanismus darstellt.

## 1.4 Der NMDA-Rezeptor

### 1.4.1 Struktur und Eigenschaften

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter und für die nozizeptive Signalübertragung verantwortlich (Doraiswamy, 2002). Die Glutamat-Rezeptoren sind transmittergesteuert und erhöhen im geöffneten Zustand den Einstrom von  $\text{Na}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Nervenzelle (Lipton, 2004).

Folgende Rezeptoren gibt es:

- NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren
- AMPA-( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionac)-Rezeptoren
- Kainat-Rezeptoren

Neben den AMPA- und den Kainat-Rezeptoren, welche hauptsächlich von  $\text{Na}^{+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Ionen passiert werden, sind die NMDA-Rezeptoren die wichtigsten postsynaptischen Glutamat-Rezeptoren. Diese besitzen eine hohe Durchlässigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, deren zeitlich begrenzter Anstieg im postsynaptischen Spalt Signalgeber für biochemische Prozesse ist (Hoyte, 2004). Als Kontrollmechanismus der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren dient die spannungsabhängige Blockade durch Magnesium-Ionen. Bei einem Ruhe-Membranpotenzial von -70 bis -50 mV ist diese Blockade am stärksten und kann somit einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verhindern. Mit Depolarisierung (Erregung der Zelle) der Membran gibt das  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion die Bindungsstelle am Ionenkanal frei und ermöglicht die Aktivierung des NMDA-Rezeptors (Seeburg, 2006; Lipton, 2004; Trujillo, 1995).

Im pathologischen Zustand, wie zum Beispiel bei der zerebralen Hypoxie oder der Alzheimer'schen Krankheit, können die Neuronen aufgrund der fehlenden Energie die Homöostase nicht aufrechterhalten. Durch eine Depolarisierung kommt es nun zur Aktivierung des NMDA-Rezeptors und Magnesium löst sich von seiner Bindungsstelle am Ionenkanal. Aus der exzessiven NMDA-Rezeptoraktivierung resultiert ein erhöhter Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, der zur Produktion von freien Radikalen und weiteren enzymatischen Prozessen führt, die zum neuronalen Zelltod beitragen (Lipton, 2004; Choi, 1988). Auch wenn Alzheimer, zerebrale Hypoxie und Demenzerkrankungen auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen, so führen sie doch alle gemeinsam über denselben allgemeinen Signalweg zur Überstimulation der Glutamat Rezeptoren, besonders der NMDA-Subtypen (Merz, 2006; Lipton, 2004).

NMDA-Rezeptoren sind aus sieben Untereinheiten aufgebaut – NR1, NR2A-D sowie NR3A-B – und bestehen entweder aus heterotetrameren oder aus -pentameren Strukturen (Hollmann und Heinemann, 1994). Die essenzielle NR1-Untereinheit trägt die Glycin-B-Bindungsstelle des

NMDA-Rezeptors und die vierfache NR2-Untereinheit (NR2A, 2B, 2C, 2D9) die Glutamatbindungsstelle (Laube, 1997; Hirai, 1996; Kuryatov, 1994). Die NR3-Untereinheit kann die Rezeptorfunktion hemmen, ohne jedoch einen Rezeptorkanal zu bilden (Ciabarra et al., 1995).

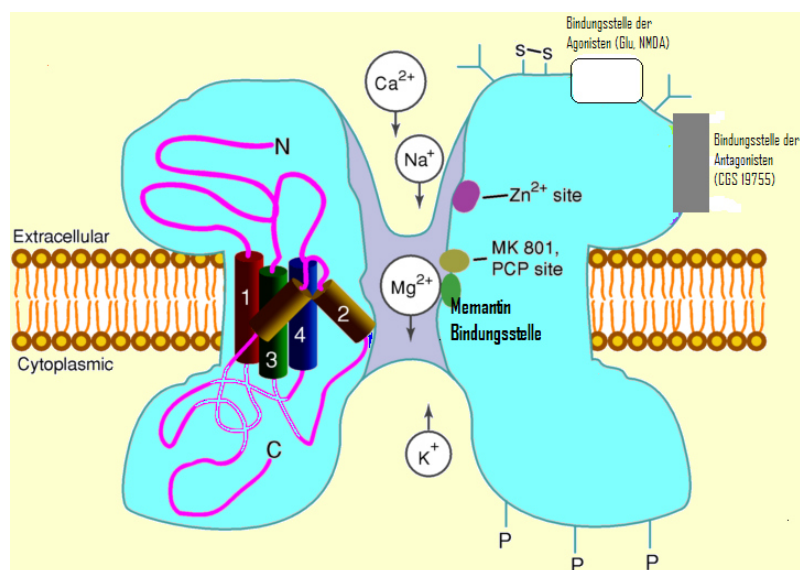


Abbildung 3: NMDA-Rezeptor

### 1.4.2 NMDA-Rezeptoragonist und -antagonisten

#### NMDA

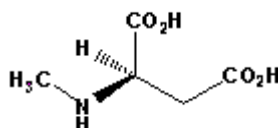


Abbildung 4: Strukturformel von NMDA

#### Memantin

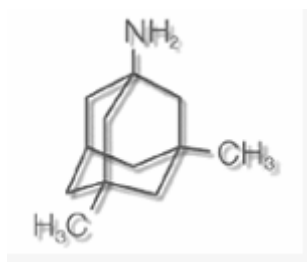
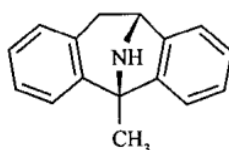


Abbildung 5: Strukturformel von Memantin

Memantin ist ein nichtkompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist mit einer niedrigen Affinität (Müller, 1995), aber einer hohen Selektivität gegenüber dem Rezeptor, welcher nur solche Ionenkanäle blockiert, die bereits geöffnet sind (Lipton, 2004). Er ist zurzeit der wichtigste Antagonist, der als Wirkstoff gegen die Alzheimer-Erkrankung zugelassen ist (zulassungsrelevante Studien: Reisberg et al., 2003; Winblad und Poritis, 1999).

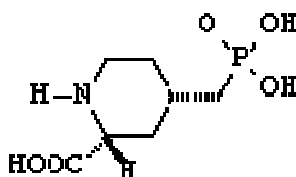
## MK-801



**Abbildung 6:** Strukturformel von MK-801  
([www.biochemsoctrans.org/.../0297/bst0280297.html](http://www.biochemsoctrans.org/.../0297/bst0280297.html))

MK-801, (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo(a,d)cyclohepten-5,10-imin), ist ein liquorgängiger NMDA-Rezeptorantagonist, dessen Wirkprinzip auf einer selektiven, nicht kompetitiven Blockade des NMDA-Rezeptors durch eine hoch affine Bindung an die Phencyclidin(PCP)-Bindungsstelle beruht, die im Ionenkanal des Rezeptors neben der Bindungsstelle der  $Mg^{2+}$ -Ionen liegt.

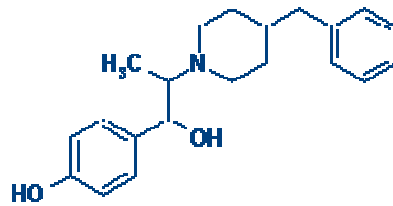
## CGS



**Abbildung 7:** Strukturformel von CGS  
([www.uic.edu/classes/phar/phar402/Patent8.gif](http://www.uic.edu/classes/phar/phar402/Patent8.gif))

CGS19755, Cis-4-(phosphonomethyl)-piperidin-2-carbonsäure, ist ein kompetitiver Antagonist der Glutamatbindungsstelle am NMDA-Rezeptor.

## Ifenprodil



**Abbildung 8:** Strukturformel von Ifenprodil  
([www.bris.ac.uk/.../info/pharmacology/NMDA.html](http://www.bris.ac.uk/.../info/pharmacology/NMDA.html))

Ifenprodil ist ein nichtkompetitiver, selektiver Antagonist der Untergruppe NR2B des NMDA-Rezeptors (Perin-Dureau, 2002; Lovinger, 1995; Williams, 1993). Auch wenn sein Wirkmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, weiß man, dass seine Selektivität bei höheren Konzentrationen stark vermindert ist, so dass bei einer Ifenprodil-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zusätzlich auch AMPA- und Kainat-Rezeptoren gehemmt und die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle blockiert werden (Church et al., 1994).

## 1.5 Aufgaben- und Zielstellung

Um degenerative Erkrankungen effektiver behandeln zu können, wurden bisher mehrere Studien über den Einfluss von NMDA-Rezeptorantagonisten auf hypoxiebedingte Zellschädigungen durchgeführt (Garcia de Arriba et al., 2006; Bach et al., 2005; Lipton, 2004; Ley und Herdegen, 2004). Seit Kurzem wird dieser Effekt von NMDA untersucht (Zhu et al., 2005; Gascon et al., 2005). Aufbauend auf die bisherigen Ergebnisse soll in dieser Arbeit der neuroprotektive Unterschied der NMDA-Rezeptorantagonisten CGS, Memantin und Ifenprodil sowie Roscovitin und NMDA auf die hypoxiebedingte Zellschädigung an embryonalen kortikalen Zellen von Ratten untersucht werden.

Dazu sind drei Versuchsreihen vorgesehen:

1. Mittels einer LDH-Methode soll die Zellvitalität durch den Anstieg der LDH-Konzentration nach hypoxieinduzierter Zellschädigung bestimmt werden und welchen Einfluss NMDA, die NMDA-Rezeptorantagonisten und Roscovitin auf die LDH-Konzentration haben.
2. Durch die Bestimmung der Bildung der freien Sauerstoffradikale soll der Einfluss von NMDA und seinen Rezeptorantagonisten, Memantin und Ifenprodil, charakterisiert werden.
3. Es soll der Einfluss von Memantin, Ifenprodil und NMDA auf die apoptotische Veränderung durch die hypoxiebedingte Schädigung mittels der Caspase-3-Aktivität untersucht werden.

**Ziel der Untersuchungen ist es, die neuroprotektive Wirkung von Memantin, MK-801, CGS, Ifenprodil, NMDA und Roscovitin auf die hypoxieinduzierte Zellschädigung an kortikalen Zellen zu erfassen und von diesen die protektivste Verbindung herauszufiltern.**

Als Testmodell werden 16 Tage alte kortikale Zellen von Rattenembryonen verwendet.



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zellkulturmedium, Chemikalien, Reagentien

- 2',7'-Dichlorhydrofluorescein Diacetat (H2DCFDA) Stammlösung: 50 mM in DMSO (D-399) (Molecular Probes Europe B.V., Leiden, Niederlande)
- Apo-One Homogeneous Caspase-3/7 Assay (G7790) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)
- Albumin Standard PIERCE 2,0 mg/ml (23209) (Perbio Science, Bonn, Deutschland)
- Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay (PIERCE, Perbio Science, Bonn, Deutschland)
  - Reagenz A (23223): BCA, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>; pH: 11,25
  - Reagenz B (23224): CuSO<sub>4</sub>
- CGS 19755 cis-4-(Phosphonomethyl)-piperidin-2-carbo (C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>) M.W.=227.67 (Serienr. 1A/51710) (Tocris, Ellisville, MO, USA)
- destilliertes Wasser (2. Reinheitsstufe) (Behr Labor-Technik, Düsseldorf, Deutschland)
- D-(+)-Glucose (G6152) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM-F12) (1:1) +GlutaMAX (+Phenolrot) (31331-028) (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM-F12) (1:1) (15 mM HEPES-Puffer, L-Glutamine, Pyridoxine HCL, ohne Phenolrot) (11039-021) (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
- fötales Kälberserum (FKS) (S0115) (Biochrom Ab, Berlin, Deutschland)
- Hanks gepufferte Salzlösung (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) (Ca, Mg-frei) (KCl-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaCl-NaHCO<sub>3</sub>-NaHPO<sub>4</sub>, D-Glucose, Phenolrot) (14170-088) (Gigco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
- HEPES gepufferte Kochsalzlösung 0,5 mM (HBS): (NaCl-KCl-Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-CaCl<sub>2</sub>-NaOH) pH: 7,4 mit Glucose (10 mM) oder ohne Glucose (laboreigene Herstellung)
- HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure) C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S (H4034 – 100 g) (Sigma-Aldrich, Stenheim, Deutschland)
- Ifenprodil Tartrat  $\alpha$ -(4-Hydroxyphenyl)- $\beta$ -methyl-4-benzyl-1-piperidineethanol (C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·\* C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub> (I-2892) (FW 801) Stammlösung: 2,5 mM in destilliertem, autoklaviertem Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

- Memantin Hydrochlorid (M9292-25MG) (FW 215,8) Stammlösung: 25 mM in destilliertem, autoklaviertem Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Mitoseinhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
  - Ara-C (Cytosin- $\beta$ -D-arabinofurosid) (C1768)
- MK-801 Hydrogenmaleat [(5*R*,10*S*)-(+)-5-Methyl-10,11-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imin Hydrogenmaleate]; Dizocilpine (M-107) (FW 337,4) Stammlösung: 1 mM in destilliertem, autoklaviertem Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) (M3262-250MG) (FW 147,1) Stammlösung: 500  $\mu$ M in destilliertem, autoklaviertem Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Opti-MEM 1 serumreduziertes Medium (L-Glutamin, NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, Na-Pyruvat, Hypoxanthin, Thymidin, Spurenelemente, Wachstumsfaktoren, Phenolrot) (31985-047) (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
- Penicillin-Streptomycin (15750-037) (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
- Retinsäure (R2625-100 mg) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Poly-L-Lysin hydrobromide P-9155 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Roscovitine R-7772 (C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O) (FW 354,5) Stammlösung: 20 mM in destilliertem, autoklaviertem Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Triton X100 (K21052605713) (Alkylphenylpolyethylenglykol) (E. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Trypanblau-Lösung 0,4% (T8154) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Trypsin (L-11-002) 25% in PBS ohne Calcium und Magnesium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

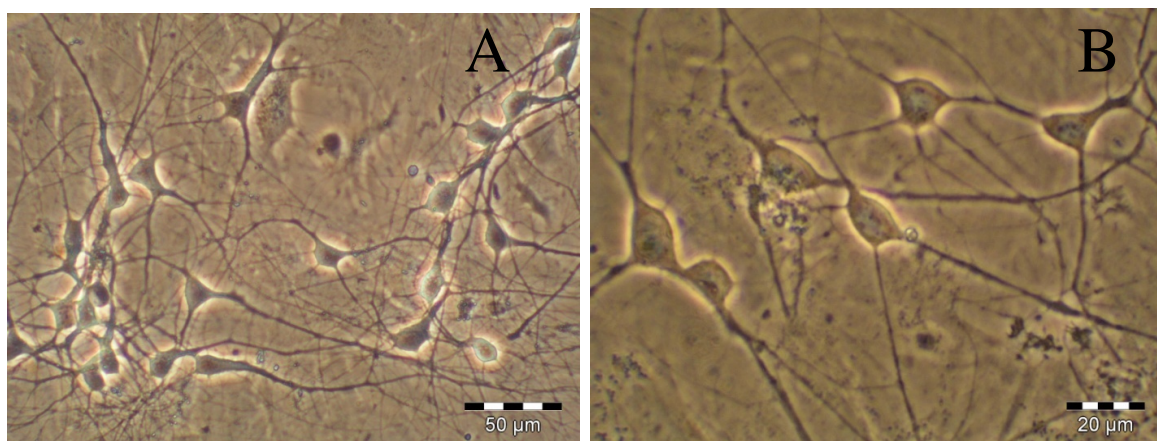
- CO<sub>2</sub>-Inkubator CB (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Combitips plus 5 ml, Bestellnr. 0030 069.250; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- FACS-calibur flow cytometer mit Cellquest<sup>®</sup> Software (Becton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA)
- Fluoreszenzspektrometer FluoroMax-2 (Seriennr. 6029) (Instruments S.A. Group Jobin Yvon Spex, Edison, NJ, USA)
- Fluorimeter Fluostar (Fluorstar, BMG Labtechnologies, Offenburg, Deutschland)
- Inkubator Heraeus Hera cell (Heraeus, Gera, Deutschland)
- Membranfilter (83.1826.001) Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

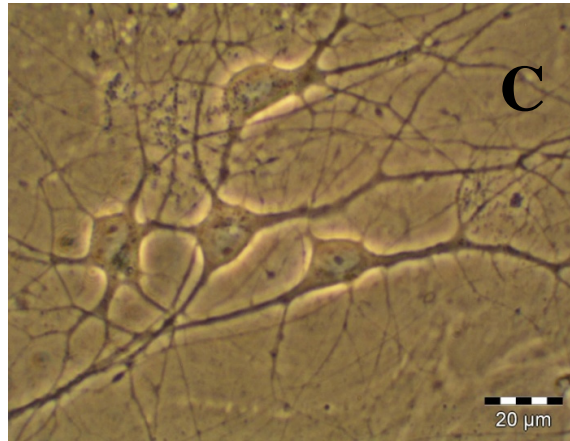
- Mikroplatte-96 Loch (655101) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Mikroskop (OLYMPUS CK2-TR, Japan)
- Multipipette® plus (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipetten: 1000-5000, 100-500, 10-100 und 0,5-10 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitze 1000 µl (10030 000.919) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen 1000, 200 und 10 µl (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- PP-Röhrchen 15 ml (188271) und 50 ml (210261) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Reaktionsgefäß 1,5 ml (72.690) (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäß 0,5 ml (710918) (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf, Deutschland)
- Rundbodenröhrchen, Polystyrol 5 ml (352054) (BD Biosciences Discovery Labware, Erembodegem-Dorp, Belgien)
- signal photomultiplier detector (PMT) standard detector, Model R1527P (Instruments S.A. Group Jobin Yvon/ Spex, Edison, New Jersey)
- Spektrophotometer Multiskan Ascent Model Nr. 354 Seriennr. 354-00497T (Labsystems Oy, Helsinki, Finnland)
- Spectroscopy software DM3000F (Instruments S.A. Group Jobin Yvon/ Spex, Edison, New Jersey)
- Xenom-Lampe XBO 150W/CR OFR (Instruments S.A. Group Jobin Yvon/ Spex, Edison, NJ, USA)
- Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik (GLF), Burgwedel, Deutschland)
- Zählkammer Neubauer (Fein-Optik, Bad Blankenburg, Deutschland)
- Zellkulturflaschen 50 ml, 25 cm<sup>2</sup> (2690160) und 250 ml, 75 cm<sup>2</sup> (2658170) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturplatten-12 Loch (665180) und -48 Loch (677180) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Zellschaber (541070) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R (Heraeus, Gera, Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung kortikaler Neurone

Die Primärkulturen kortikaler Neurone (Abbildung 9) wurden aus Kortexgewebe 16 Tage alter Rattenembryonen hergestellt. Die Präparate wurden in 4 °C kalte Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) unter Zusatz von Gentamicin (50 µg/ml) überführt, in einem 15-ml-Röhrchen gesammelt und 2 x mit HBSS gewaschen (je ca. 5 ml). Die enzymatische Dissoziation erfolgte mit 5 ml HBSS und 5 ml 0,25%igem Trypsin für 7 min im 37°C warmen Wasserbad. Der Überstand wurde verworfen und es wurde mit 5 ml DMEM aufgefüllt. Die Suspension wurde mittels einer rundgeschmolzenen 5-ml-Glaspipette (ca. siebenmal) vorsichtig trituriert, durch ein Nylon-Zellsieb filtriert und im Anschluss daran 5 min bei 194 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand mit 5 ml Medium resuspendiert. Aus 20 µl der Suspension, 60 µl HBSS und 20 µl Trypanblau-Lösung (0,4%) erfolgte nun die Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Aussaat wurde in einer 48-Well-Zellkulturplatte platziert (10.000 Zellen/well), deren Oberfläche zuvor mit 25 µg/ml Poly-L-Lysin behandelt und zweimal mit HBSS bzw. mit destilliertem Wasser gespült worden war. Als Medium wurde D-MEM-F12 im Verhältnis 1:1 (+Glutamat), unter Zusatz von 20%igem fötalem Kälberserum, 36 mM D-Glucose, 50 µg/ml Gentamicin und 15 mM HEPES-Puffer, verwendet. Am sechsten Kultivierungstag wurden zur Hemmung der Gliazellen die Kulturen mit dem Mitoseinhibitor Cytosin-β-D-arabinofurosamid (Ara-C; 10 µM) für 24 h behandelt. Die Zellkulturen wurden neun Tage im Inkubator unter normoxischen Bedingungen (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>, 37°C) gehalten.





**Abbildung 9:** Phasenkontrastaufnahme einer 15 Tage alten Primärkultur kortikaler Zellen der Ratte in 200- (A) und 400-facher (B und C). Morphologie der kortikalen Zellen unter normoxischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>).

### 2.2.2 Hypoxie-Modell

Für den Versuch wurden zwei 48-Well-Zellkulturplatten mit 15 Tage alten kortikalen Zellen verwendet. Eine Kulturplatte wurde für 4 h unter hypoxischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 1% N<sub>2</sub> und 1% O<sub>2</sub>) inkubiert. Dazu wurde sie mit HEPES-Puffer (ohne Glucose) gewaschen und anschließend mit ca. 150 µl derselben Pufferlösung bedeckt (Abbildung 10). Die zweite Platte, für die Normoxie, wurde mit glukorisiertem HEPES-Puffer gewaschen, mit ca. 150 µl dieser Lösung wieder aufgefüllt und für 4 h unter normoxischen Bedingungen bei 37°C (5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft) inkubiert (Abbildung 10). Dann wurde der HEPES-Puffer entfernt und alle Zellen wurden mit DMEM gewaschen. Die Kulturen wurden mit 250 µl/Vertiefung DMEM bedeckt und für weitere 24 h unter normoxischen Bedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luft) inkubiert (Abbildung 10). Anschließend wurde das Medium entfernt, es wurden 500 µl/Vertiefung gepufferte NMDA-Rezeptoragonisten und -antagonisten (Tabelle 1) in die Zellkulturplatte pipettiert und die Ansätze wurden für weitere 24 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

Je 500 µl wurden aus zwei Vertiefungen in ein 1-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 210 rpm zentrifugiert. 700 µl Überstand wurde herauspipettiert, in eine 48-Well-Zellkulturplatte überführt. Der Rest wurde verworfen.

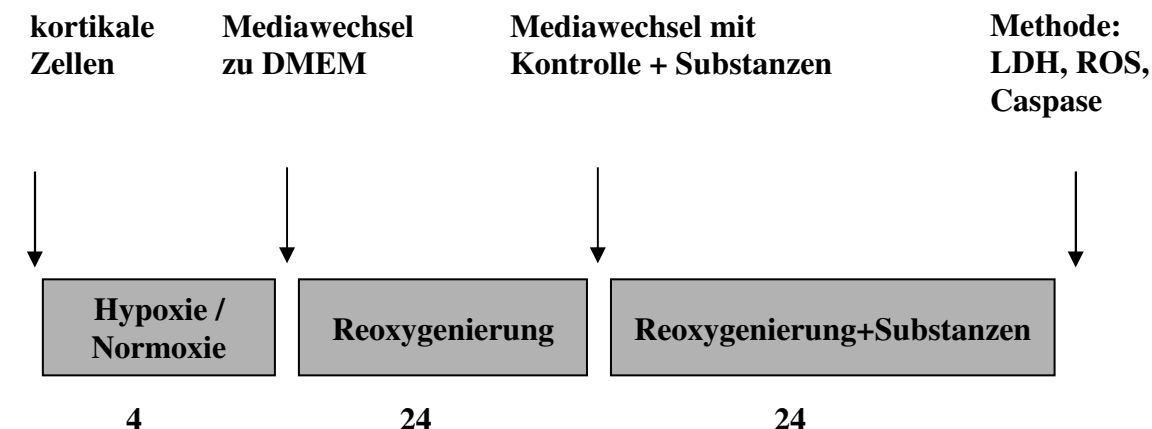


Abbildung 10: Schema zur Darstellung des Hypoxiemodells

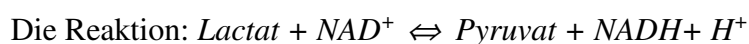
Tabelle 1: Gepufferte NMDA-Rezeptoragonisten und –antagonisten

	Stammlösung	MW	Endkonzentration	ml/10 ml DMEM
<b>NMDA</b>	5 mM	147,1 (FW)	5 µM	0,01
<b>Memantin</b>	5 mM	215,8 (FW)	0,5 µM	0,001
<b>Memantin</b>	25 mM	215,8 (FW)	5 µM	0,002
<b>Memantin</b>	25 mM	215,8 (FW)	50 µM	0,02
<b>Ifenprodil</b>	2,5 mM	409,5	10 µM	0,04
<b>MK-801</b>	50 mM	337,4 (FW)	50 µM	0,01
<b>CGS</b>	25 mM	227,67	10 µM	0,004
<b>Roscovitin</b>	20 mM	354,5 (FW)	10 µM	0,005

### 2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität mit der LDH-Methode

Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in fast allen Körperzellen in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden ist. Es existieren fünf Isoformen der LDH, die als LDH-1 bis LDH-5 bezeichnet werden und die jeweils in bestimmten Organen nachweisbar sind. LDH-1 und 2 sind in Herzmuskelzellen, Erythrozyten und Niere, LDH-4 und 5 in Leber und Skelettmuskelzellen zu finden (Hofmann, 1999).

Das Enzym, eine reversible Oxidoreduktase, wird im anaeroben Stoffwechsel zur Regenerierung des in der Glykolyse benötigten  $NAD^+$  benötigt und katalysiert die Übertragung von Wasserstoff gemäß der folgenden Reaktionsgleichung (Hofmann, 1999):



Die LDH-Methode beschreibt ein Verfahren zur photometrischen Messung von freier LDH in Zellkulturen. Kommt es durch die Gabe von cytotoxischen Substanzen zum Absterben der Zellen, wird das Enzym durch die Schädigung der Plasmamembran aus den Zellen freigesetzt und die LDH-Konzentration im Medium steigt. Somit lässt sich sagen, dass die LDH-Aktivität proportional zur Anzahl der toten Zellen ist.

Das für die Bestimmung verwendete Cytotoxicity Detection Kit nutzt ein präzises kolorimetrisches Verfahren, das auf dem quantitativen Nachweis der LDH-Aktivität von geschädigten Zellen basiert.

Für die LDH-Bestimmung wurden aus der Normoxie- und aus der Hypoxie-Zellkulturplatte je 50 µl Probe/Vertiefung in eine 96-Well-Mikroplatte übertragen. Das Reagenz, bestehend aus Katalysator und Färbemittel im Verhältnis 0,25:11,5, wurde direkt vor Gebrauch angemischt und sofort mit jeweils 50 µl den Proben zugeführt. Darauf wurden die Mikrotiterplatten für 45-60 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Platten vor Licht geschützt werden sollten (Abbildung 11).

Die LDH-Aktivität wurde spektrophotometrisch mit einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Dieses Gerät ermöglicht die gleichzeitige Messung mehrerer Proben (Abbildung 11).

Für die Bestimmung des Leerwertes wurde die Zellsuspension durch DMEM ersetzt. Die so erhaltenen Daten wurden mit einer Software (Excel®) bearbeitet und die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SEM der LDH-Konzentration in % der Normoxie-Kontrolle dargestellt.

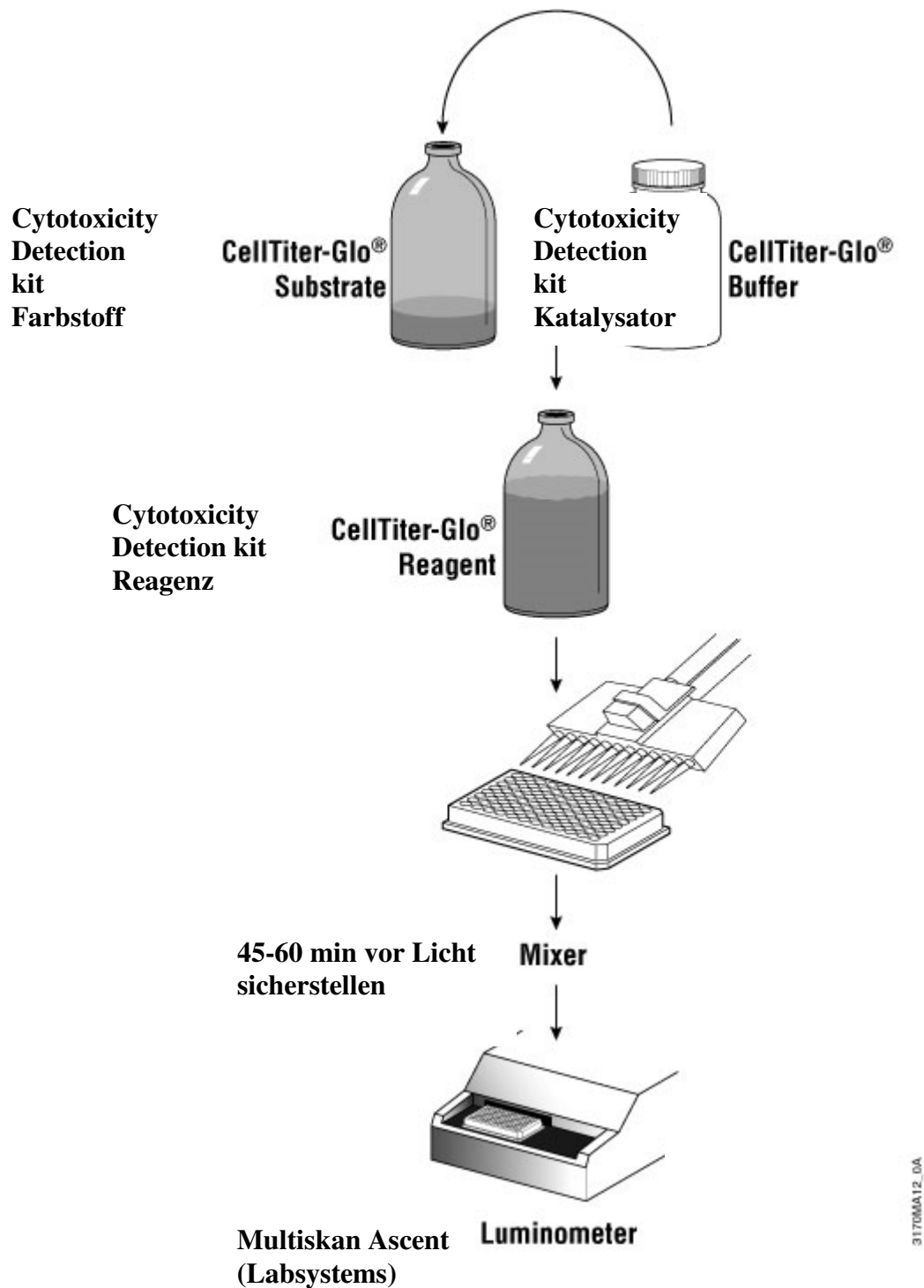


Abbildung 11: LDH Detection Kit

#### 2.2.4 Analyse der Bildung freier Sauerstoffradikale

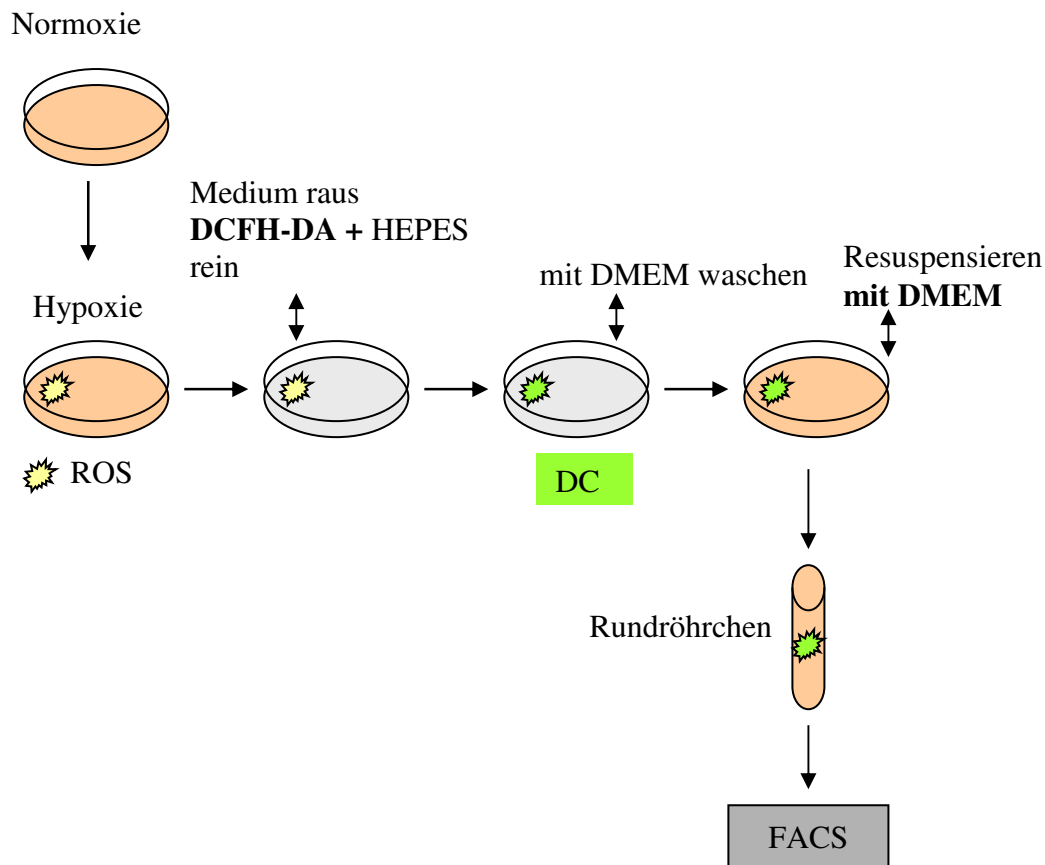
Die intrazelluläre Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS) wurde unter Verwendung von 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat (2',7'-H<sub>2</sub>DCF-DA) bestimmt. 2',7'-H<sub>2</sub>DCF-DA wird von den Zellen aufgenommen und intrazellulär mit Sauerstoff- und Stickstoffspezies zum Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlordihydrofluorescein (DCF) deacetyliert, wobei das deacetylierte,



fluoreszierende Reaktionsprodukt in den Zellen verbleibt. Die Fluoreszenzemission gibt somit Auskunft über den intrazellulären Sauerstoffmetabolismus.

Für diese Methode wurden zwei vorbehandelte (siehe Hypoxie-Methode: Abbildung 10) 48-Well-Zellkulturplatten (1x Normoxie, 1x Hypoxie) verwendet. Das Medium wurde vor Versuchsbeginn entfernt und die Zellen mit HEPES und Fluoreszenzfarbstoff bzw.  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (100  $\mu\text{M}$ ) in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS –  $\text{CaCl}_2$ , –  $\text{MgCl}_2$ ) 45 min lang bei  $37^\circ\text{C}$  in Dunkelheit inkubiert (Abbildung 11). Danach wurden die Zellen von dem Medium befreit, mit phenolfreiem DMEM gewaschen und anschließend mit der gleichen Lösung resuspendiert (Abbildung 12). Danach wurde die Kultur mit einer Pipette suspensiert und in Polystyrol-Reagenzgläser auf Eis überführt (Abbildung 12).

Die Änderung der DCF-Fluoreszenz wurde mittels eines Fluorimeters gemessen. Die Anregung erfolgte bei 485 nm, die Emission wurde bei 520 nm gemessen. Die so erhaltenen Daten wurden mit einer im Fluorimeter integrierten Software (Excel<sup>®</sup>) bearbeitet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM der Änderung der ROS-Bildung in % der Normoxie-Kontrolle, welche mit 100 % angesetzt wurde, dargestellt.



**Abbildung 12:** Versuchsmodell für den Nachweis freier Sauerstoffradikale

### 2.2.5 Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität

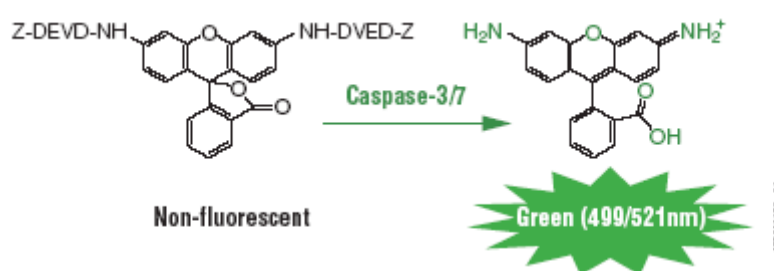
Mit Hilfe des Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7-Assays (Promega) wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 fluorimetrisch bestimmt. Um die unterschiedliche Zelldichte in den Kulturschalen zu berücksichtigen, wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, und zwar nach der BCA-Methode (Smith et al., 1985).

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Nach dem Waschen der Zellen mit glucosefreier HBS wurden 100 µl dieser Pufferlösung in jede Vertiefung der 48-Well-Zellkulturplatte appliziert. Anschließend wurden die Lösungen aus vier Vertiefungen in einer zusammengefasst, sodass sich 400 µl pro Well-Zellkulturplatte ergaben.

Mittels einer Pipette wurde eine Suspension hergestellt, die im Durchschnitt 40.000 Zellen enthielt. Aliquots dieser Suspension (100 µl für die Fluoreszenzmessung, 120 µl zur Proteinbestimmung) wurden in 1-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und auf Eis gelagert.

### 2.2.6 Fluorimetrische Messung <sup>1</sup>

Der verwendete Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7-Assay besteht aus einem Lysis-Puffer und einem profluoreszenten Substrat, dem Rhodamin-110-bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Asparaginsäureamid) (Z-DEVD-R-110). Nach der Zelllyse spalten die Caspasen 3 und 7 die DEVD-Peptide ab, so dass freies Rhodamin 110 entsteht, welches bei einer Anregungswellenlänge von 499 nm grün fluoresziert (Promega Protokoll).



**Abbildung 13:** (Promega, USA): Spaltung des profluoreszenten Caspase Substrates Z-DEVD-R110 durch Caspase-3/7 und Entstehung des fluoreszierenden Rhodamin 110

Die Intensität der Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenz-Spektrometer bei 499 nm erfasst (Schwedt, 1981). Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurden zunächst zweimal je 50 µl der Zellsuspension entnommen und in zwei weitere 0,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Apo-One® Caspase-3/7-Reagenz wurde durch Mischen von Substrat und

<sup>1</sup> Zur Ergänzung der Arbeit wurden die Methoden der fluorimetrischen Messung und der Proteinbestimmung aus der Doktorarbeit von C. Düerkop übernommen.

Puffer im Verhältnis 1:100 erhalten. 50 µl dieses Reagenz wurden in die mit jeweils 50 µl Zellsuspension vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (Promega Protokoll). Die Herstellung des Reagenz wie auch die nachfolgenden Schritte erfolgte im abgedunkelten Raum. Die Xenon-Lampe (150 Watt) des Fluoreszenz-Spektrometers wurde eine halbe Stunde vor Messbeginn angeschaltet, um eine konstante Lichtintensität zu gewährleisten. Vor jeder Messreihe erfolgte eine Kalibrierung des Anregungsspektrums (Spektrum der Xenon-Lampe, Normwert:  $467 \pm 0,5$  nm) und des Emissions-Messspektrums (Raman-Spektrum von Wasser, Normwert:  $397 \pm 1$  nm). Um das für die Messung benötigte Füllvolumen der Messküvette von 1,5 ml zu erreichen, wurden 600 µl dest. Wasser vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl der Probelösung hinzugegeben und vermischt. Für die Bestimmung des Leerwertes wurden 50 µl Zellsuspension durch 50 µl HBS ersetzt. Die Hintergrundfluoreszenz der Zellen wurde durch eine Normoxie-Kontrolle ohne Zusatz von Reagenz ermittelt. Die Emission wurde in einem Bereich von 510-550 nm gemessen. Das Fluoreszenzmaximum lag bei einer Wellenlänge von 521/522 nm. Mit Hilfe der Software Microsoft Excel® erfolgte nach Abgleich mit der Proteinkonzentration die grafische Darstellung der Caspase-3/7-Aktivität in % der Normoxie-Kontrolle, welche mit 100% angesetzt wurde.

### 2.2.7 Proteinbestimmung<sup>2</sup>

Zur Proteinbestimmung wurde der Bicinchoninsäure(BCA)-Protein-Assay verwendet. Die enthaltenen Reagenzien A (Pufferlösung mit BCA) und B (Kupfersulfatlösung) wurden in einem Verhältnis von 50:1 zusammengegeben (Perbio Protokoll). Die BCA-Methode beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen) in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Dabei werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch die Seitenketten der Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan sowie durch die Peptidbindung zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert. Diese bilden mit der BCA violette Farbkomplexe, welche mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 562 nm quantitativ erfasst werden können (Smith et al., 1985). Als Kalibrationsstandard diente mit destilliertem Wasser verdünntes Rinder-Serumalbumin (BSA; Stammlösung 2 mg/ml) in den Konzentrationen 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 und 1,0 mg/ml. Um ein Eindringen des Reagenz in die Zelle zu ermöglichen, wurde die Zellmembran mit Triton X-100 (1%) lysiert. Hierzu wurden 120 µl der Zellsuspension mit 30 µl Triton im Verhältnis 5:1 in 1-ml-Reaktionsgefäßen gemischt und für 30 min inkubiert. Der Kalibrationsstandard

---

<sup>2</sup> Zur Ergänzung der Arbeit wurden die Methoden der fluorimetrischen Messung und der Proteinbestimmung aus der Doktorarbeit von C. Düerkop übernommen.

wurde im Dreifachansatz gemessen, die Proben im Doppelansatz. In jede Vertiefung der verwendeten 96-Well-Mikrotiterplatte wurden je 50  $\mu$ l Zellsuspension vorgelegt, zu der mittels einer Multipipette je 100  $\mu$ l Reagenz zugefügt wurden. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung mit einem Absorptions-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen einen Referenzfilter von 690 nm. Für die Bestimmung des Leerwertes wurde die Zellsuspension durch die verwendete Pufferlösung (HBS) ersetzt. Die Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung der Software Microsoft Excel®. Die Proteinkonzentrationen (mg/ml) wurden mittels der Kalibrationsgeraden des BSA-Standards berechnet.

### **3 Ergebnisse**

Zur Untersuchung der hypoxiebedingten Schädigung wurden zwei 48-Well-Zellkulturplatten mit 15 Tage alten kortikalen Zellen der Ratte verwendet. Eine Kulturplatte wurde für 4 h mit HEPES-Puffer (ohne Glucose) unter hypoxischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 1% N<sub>2</sub> und 1% O<sub>2</sub>) inkubiert. Die zweite Platte, mit glukorisiertem HEPES-Puffer, wurde für 4 h unter normoxischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft) inkubiert. Der HEPES-Puffer wurde nach 4 h entfernt, die Kulturplatten mit DMEM gewaschen und mit diesem Medium für 24 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, es wurden 500 µl/Vertiefung gepufferte NMDA-Rezeptoragonisten und -antagonisten in die Zellkulturplatte pipettiert und die Ansätze wurden für weitere 24 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

#### **3.1 Bestimmung der Zellviabilität mit der LDH-Methode**

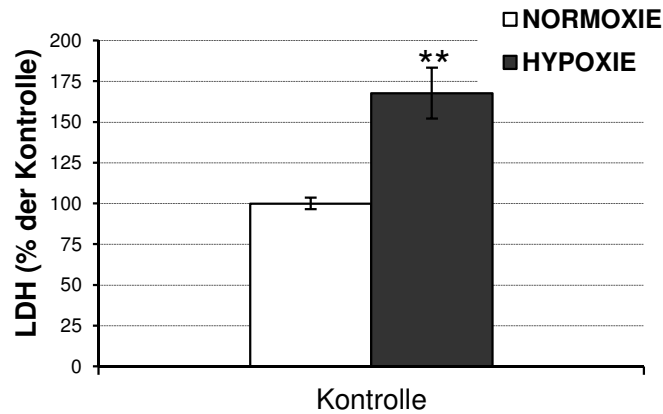
Die LDH ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in fast allen Körperzellen vorkommt. Die LDH-Methode beschreibt ein Verfahren zur photometrischen Messung von freier LDH in Zellkulturen. Kommt es zum Absterben der Zellen, zum Beispiel durch eine induzierte Hypoxie, wird das Enzym durch die Schädigung der Plasmamembran aus den Zellen freigesetzt. Im Medium kommt es zu einem Anstieg der LDH-Aktivität proportional zur Anzahl der toten Zellen.

Die LDH-Aktivität wurde spektrophotometrisch mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt.

Für die Bestimmung des Leerwertes wurde die Suspension durch DMEM ersetzt.

### 3.1.1 LDH-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung

Durch die hypoxieinduzierte Schädigung der kortikalen Zellen wurde LDH freigesetzt. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, kam es dadurch zu einem signifikanten Anstieg der Enzymkonzentration um 68% gegenüber der Normoxie-Kontrolle.



\*\* p < 0,01 vs. Kontrolle

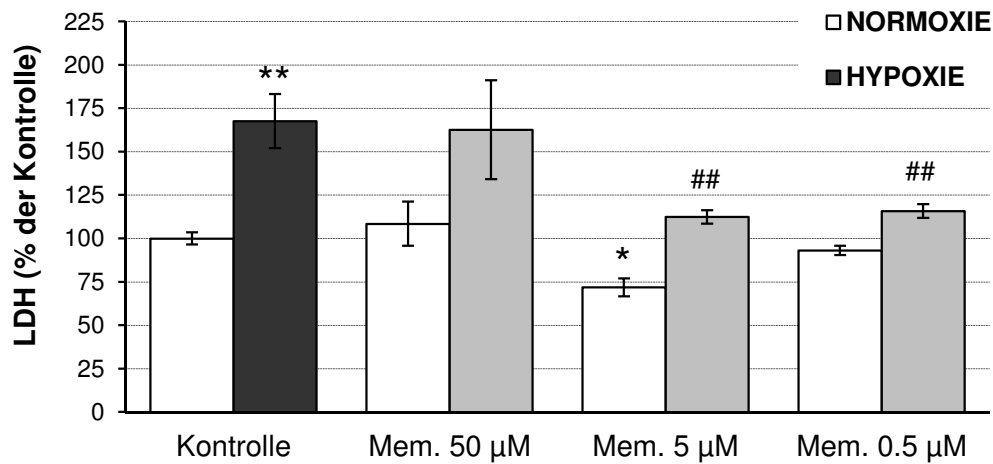
**Abbildung 14:** LDH-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung bei kortikalen Zellen. Untersucht mit der LDH-Methode und gegenüber der Normoxie-Kontrolle aufgetragen. Die kortikalen Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 48 h in DMEM unter normoxischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft) inkubiert. (\* signifikant gegen Normoxie-Kontrolle)

### 3.1.2 Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin auf die hypoxiebedingte Schädigung

Um den Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin auf die durch die 4-stündige Hypoxie hervorgerufene Nekrose zu untersuchen, wurden die kortikalen Zellen für 24 h in DMEM und für weitere 24 h mit gepuffertem Memantin in den Konzentrationen 0,5, 5 und 50 µM unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

Die LDH-Konzentration stieg nach der hypoxiebedingten Schädigung gegenüber der Normoxie-Kontrolle signifikant um 68% an (Abbildung 15). Nach der anschließenden 24-stündigen Inkubation mit Memantin (50 µM) war weder unter Normoxie- noch unter Hypoxie-Bedingungen eine signifikante Beeinflussung der LDH-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar (Abbildung 15). Die 24-stündige Behandlung der Zellen mit Memantin (5 µM) hingegen führte nach der Schädigung zu einer signifikanten Abnahme der Enzymaktivität um 56% (Abbildung 15). Im Vergleich zu den Kontrolluntersuchungen kam

es hier zu einer signifikanten Abnahme um 28% gegenüber der Normoxie-Kontrolle (Abbildung 15). Die Untersuchung mit 0,5  $\mu\text{M}$  Memantin ergab nach hypoxiebedingter Schädigung eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität um 52% gegenüber der Kontrolle.

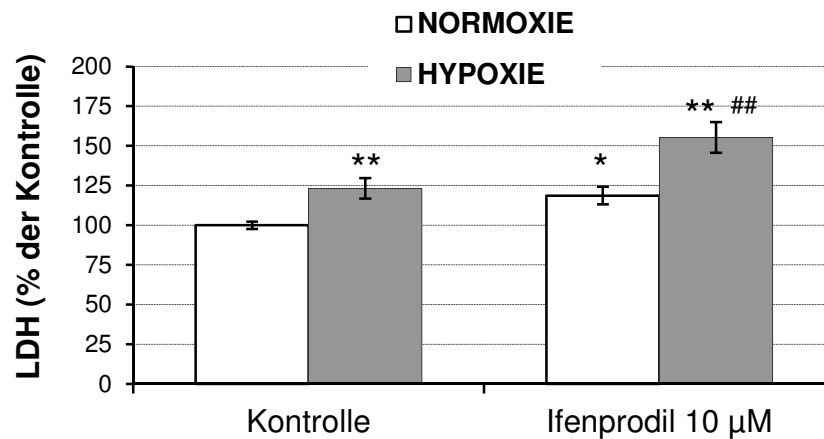


\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,01$  vs. Kontrolle

**Abbildung 15:** Einfluss von Memantin (0,5, 5 und 50  $\mu\text{M}$ ) auf die hypoxiebedingte Schädigung bei kortikalen Zellen. Untersucht mit der LDH-Methode und gegenüber der Normoxie-Kontrolle aufgetragen. Die kortikalen Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 48 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert, 24 h in DMEM (+1% FKS) und weitere 24 h mit gepuffertem Memantin. (\* $p < 0,05$  signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, ## $p < 0,01$  signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle)

### 3.1.3 Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil auf die hypoxiebedingte Schädigung

In dieser Versuchsreihe wurde nach 4-stündiger hypoxiebedingter Schädigung ein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität um 23% gegenüber der Normoxie-Kontrolle beobachtet (Abbildung 16). Die darauffolgende 24-stündige Behandlung der kortikalen Zellen mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil (10  $\mu\text{M}$ ) führt zu einem signifikanten Anstieg der Enzymaktivität um 32% gegenüber der Kontrolle (Abbildung 16). Im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle konnte ein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität um 19% nachgewiesen werden.



\*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle

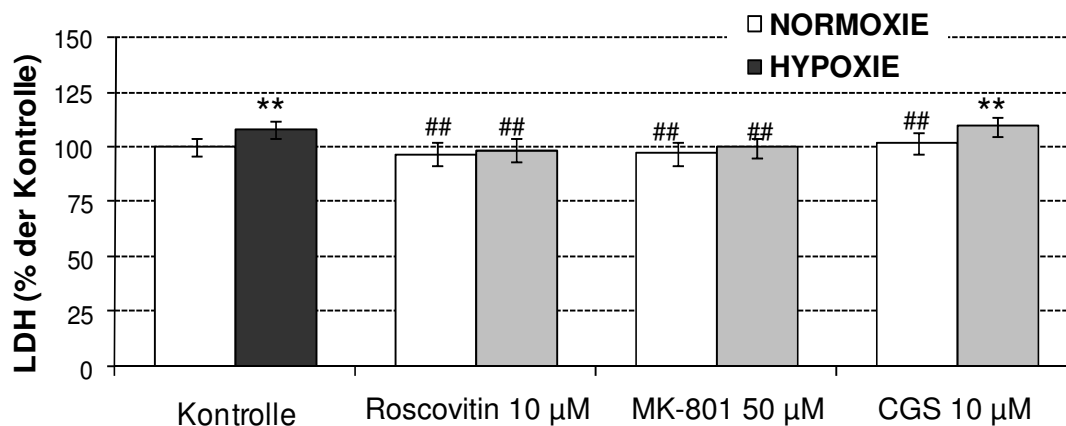
**Abbildung 16:** Einfluss von Ifenprodil (10 µM) auf die hypoxiebedingte Schädigung bei kortikalen Zellen. Untersucht mit der LDH-Methode und gegenüber der Normoxie-Kontrolle aufgetragen. Die kortikalen Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 48 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert, 24 h in DMEM (+1% FKS) und weitere 24 h mit gepuffertem Ifenprodil. (\*p < 0,05 signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, ##p < 0,01 signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle)

### 3.1.4 Einfluss von Roscovitin, MK-801 und CGS auf die hypoxiebedingte Schädigung

Um den Einfluss von Roscovitin (10 µM), MK-801 (50 µM) und CGS (10 µM) auf die durch die 4-stündige Hypoxie hervorgerufene Nekrose zu untersuchen, wurden die kortikalen Zellen für 24 h in DMEM und für weitere 24 h mit den gepufferten Substanzen unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

Die LDH-Aktivität stieg nach der hypoxieinduzierten Schädigung signifikant um 12% gegenüber der Normoxie-Kontrolle an (Abbildung 17). Unter dem Einfluss von Roscovitin (10 µM) kam es nach dieser Schädigung zu einem signifikanten Abfall der LDH-Aktivität um 13% gegenüber der Kontrolle (Abbildung 17), im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle war jedoch keine signifikante Beeinflussung nachweisbar. Die 24-stündige Behandlung der kortikalen Zellen mit MK-801 (50 µM) nach der Hypoxie zeigte eine signifikante Abnahme der LDH-Aktivität um 11%, während gegenüber der Normoxie-Kontrolle keine signifikante Beeinflussung nachweisbar war (Abbildung 17). Die 24-stündige Inkubation der Zellen mit CGS (10 µM) verursachte keine signifikanten Veränderungen der LDH-Aktivität im Vergleich zu den Kontrolluntersuchungen (Abbildung 17).





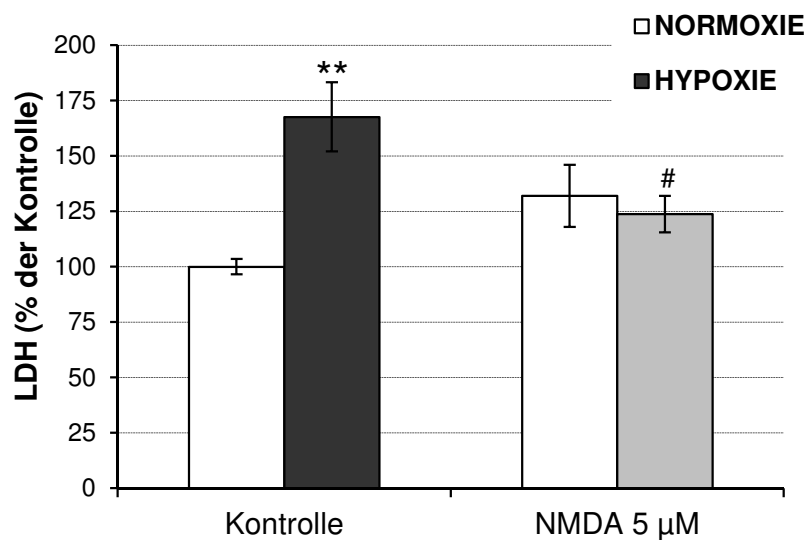
\*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle

**Abbildung 17:** Einfluss von Roscovitin (10 µM), MK-801 (50 µM) und CGS (10 µM) auf die hypoxiebedingte Schädigung bei kortikalen Zellen. Untersucht mit der LDH-Methode und gegenüber der Normoxie-Kontrolle aufgetragen. Die kortikalen Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 48 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert, 24 h in DMEM (+1% FKS) und weitere 24 h mit den gepufferten Substanzen. ((\*p < 0,05 signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, ##p < 0,01 signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle))

### 3.1.5 Einfluss von NMDA auf die hypoxiebedingte Schädigung

Um den Einfluss von NMDA (5 µM) auf die durch die 4-stündige Hypoxie hervorgerufene Nekrose zu untersuchen, wurden die kortikalen Zellen für 24 h in DMEM und für weitere 24 h mit NMDA (5 µM) unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

Die LDH-Aktivität stieg nach dieser Schädigung gegenüber der Normoxie-Kontrolle signifikant um 68% an (Abbildung 18). Nach der hypoxiebedingten Schädigung induziert NMDA eine signifikante Abnahme der LDH-Aktivität um 44% gegenüber der Hypoxie-Kontrolle. Zusammen bestätigen die Untersuchungen den neuroprotektiven Effekt des NMDA-Rezeptoragonisten. Nach 24-stündiger Inkubation unter normoxischen Bedingungen mit NMDA war keine signifikante Beeinflussung gegenüber der Normoxie-Kontrolle nachweisbar (Abbildung 18).



\*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle

**Abbildung 18:** Einfluss von NMDA (5 µM) auf die hypoxiebedingte Schädigung bei kortikalen Zellen. Untersucht mit der LDH-Methode und gegenüber der Normoxie-Kontrolle aufgetragen. Die kortikalen Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 48 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert, 24 h in DMEM (+1% FKS) und weitere 24 h mit gepuffertem NMDA. (\*p < 0,05 signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, #p < 0,01 signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle)

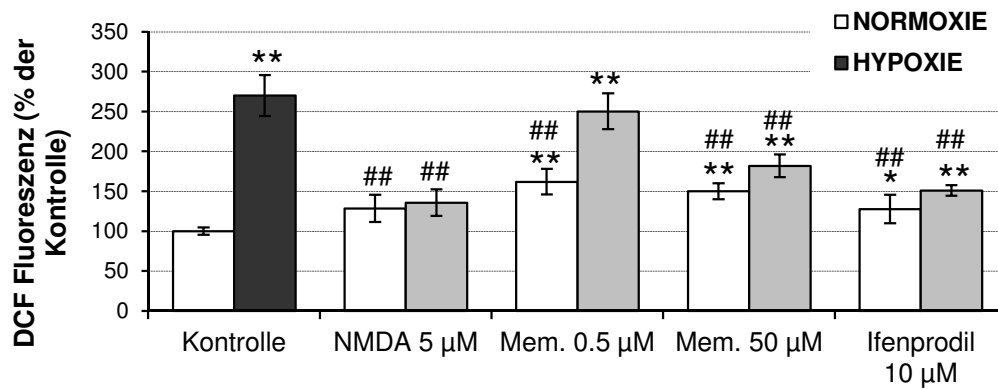
## 3.2 Bildung der freien Sauerstoffradikale (ROS)

Bei einer hypoxiebedingten Schädigung kortikaler Zellen kommt es zur Bildung freier Sauerstoffradikale. 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat (2',7'-H<sub>2</sub>DCF-DA) wird von den Zellen aufgenommen und intrazellulär mit Sauerstoff- und Stickstoffspezies zum Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) deacetyliert. Das deacetylierte, fluoreszierende Reaktionsprodukt verbleibt dabei in den Zellen, so dass die Messung der Fluoreszenz der Zellen als Maß für intrazelluläre Oxidationsprozesse verwendet werden kann.

Die DCF-Fluoreszenz-Änderung wurde mittels eines Fluorimeters gemessen und die daraus resultierenden Daten wurden mit einer im Fluorimeter integrierten Software bearbeitet.

### 3.2.1 Einfluss des NMDA-Rezeptoragonisten und der -antagonisten Memantin und Ifenprodil auf die ROS-Bildung

Durch die hypoxiebedingte Schädigung kam es zu einem signifikanten Anstieg der ROS-Bildung um 170% gegenüber der Normoxie-Kontrolle (Abbildung 19). Nach der anschließenden 24-stündigen Behandlung mit NMDA (5 µM) konnte eine signifikante Abnahme der ROS-Bildung um 134% gegen die Kontrolluntersuchungen nachgewiesen werden (Abbildung 19). Die 24-stündige Behandlung mit Memantin (0,5 µM) induzierte einen signifikanten Anstieg um 62% gegenüber der Kontrolle. Die hypoxiebedingte ROS-Bildung konnte mit Memantin (0,5 µM) gegenüber der Kontrolle nicht signifikant beeinflusst werden (Abbildung 19). Die 24-stündige Inkubation mit Memantin (50 µM) führte zu einem Anstieg der ROS-Bildung um 50% gegenüber der Normoxie-Kontrolle, nach der hypoxiebedingten Schädigung reduzierte Memantin (50 µM) die Bildung von ROS um 88% gegenüber der Kontrolle (Abbildung 19). Die Untersuchung mit Ifenprodil (10 µM) zeigte nach der Schädigung eine signifikante Abnahme der ROS-Bildung um 119% gegenüber der Kontrolle (Abbildung 19) und einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der Normoxie-Kontrolle um 28% (Abbildung 19).



\*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle

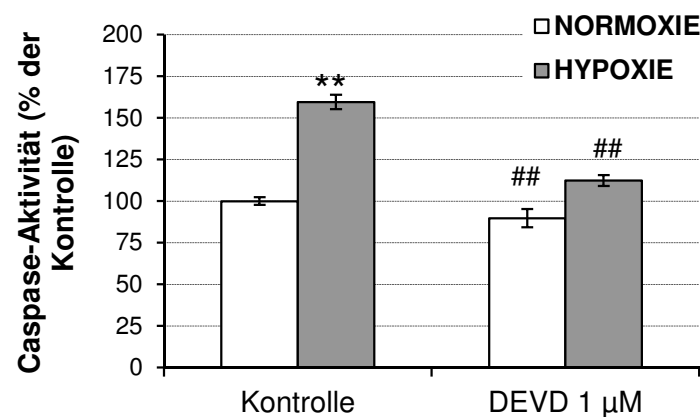
**Abbildung 19:** Einfluss von NMDA (5 µM) und der NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin (50 und 0,5 µM) und Ifenprodil (10 µM) auf die ROS-Bildung bei kortikalen Zellen. Die Fluoreszenzemission gibt Auskunft über die intrazelluläre ROS-Bildung, deren Resultate gegenüber der Normoxie-Kontrolle aufgetragen wurden. Die kortikalen Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 48 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert, 24 h in DMEM (+1% FKS) und weitere 24 h mit den gepufferten Substanzen. (\*p < 0,05 signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, ##p < 0,01 signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle)

### 3.3 Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität

Mit Hilfe des Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7-Assays (Promega) wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 fluorimetrisch bestimmt. Um die unterschiedliche Zelldichte in den Kulturschalen zu berücksichtigen, wurde eine Proteinbestimmung nach der BCA-Methode (Smith et al. 1985) durchgeführt.

#### 3.3.1 Einfluss des Caspase-Inhibitors DEVD auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung

Die Caspase-Aktivität zeigte nach hypoxiebedingter Schädigung einen signifikanten Anstieg um 60% gegenüber der Normoxie-Kontrolle (Abbildung 20). Die 24-stündige Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor (1  $\mu$ M) nach der Schädigung induzierte eine signifikante Hemmung der Caspase-Aktivität um 48% gegenüber den Kontrolluntersuchungen (Abbildung 20). Gegenüber der Normoxie-Kontrolle konnte keine signifikante Beeinflussung der Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 20). Demzufolge spielt die Caspase-Aktivität eine Schlüsselrolle in der hypoxiebedingten Schädigung.

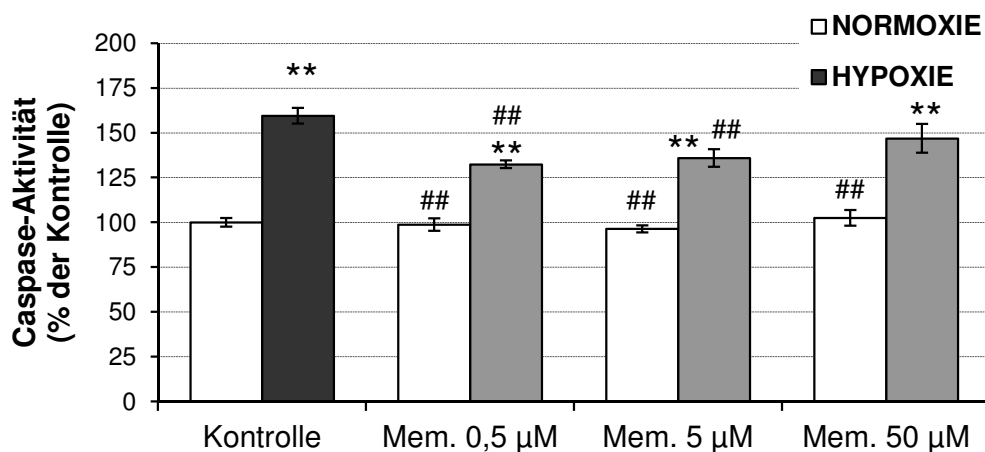


\*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle

**Abbildung 20:** Einfluss des Caspaseinhibitors (DEVD 1  $\mu$ M) auf die Caspaseaktivität nach hypoxiebedingter Schädigung bei kortikalen Zellen. Die Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 48 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert, 24 h in DMEM (+1% FKS) und weitere 24 h mit den gepufferten Substanzen. (\*p < 0,05 signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, ##p < 0,01 signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle)

### 3.3.2 Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung

Die Caspase-Aktivität zeigte nach hypoxiebedingter Schädigung einen signifikanten Anstieg um 60% gegenüber der Normoxie-Kontrolle (Abbildung 21). Dieser hypoxieinduzierte Aktivitätsanstieg konnte nach 24-stündiger Inkubation mit Memantin (0,5  $\mu$ M) signifikant um 28% gegenüber der Kontrolle reduziert werden (Abbildung 21), in der Normoxiegruppe war kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachweisbar. Die 24-stündige Behandlung mit Memantin (5  $\mu$ M) führte zu einer signifikanten Abnahme der hypoxiebedingten Caspase-Aktivität um 24%, gegenüber der Normoxie-Kontrolle war kein signifikanter Einfluss des Memantin (5  $\mu$ M) auf die Aktivität nachweisbar (Abbildung 21). Die nach der Inkubation mit Memantin (50  $\mu$ M) gemessene Caspase-Aktivität unterschied sich nicht signifikant von der Normoxie- und der Hypoxie-Kontrolle (Abbildung 21).

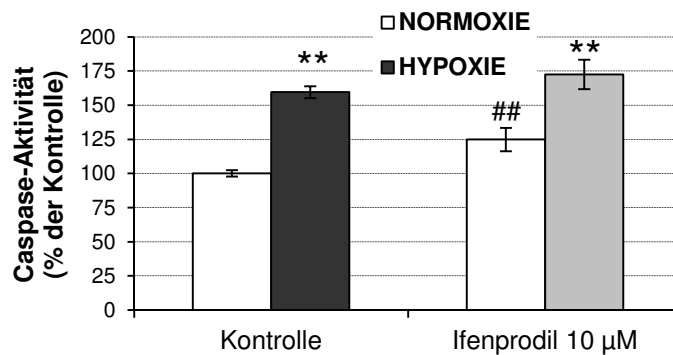


\*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle

**Abbildung 21:** Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin (50, 5 und 0,5  $\mu$ M) auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung. Die Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 48 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert, 24 h in DMEM (+1% FKS) und weitere 24 h mit den gepufferten Substanzen. (\*p < 0,05 signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, ##p < 0,01 signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle)

### 3.3.3 Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung

Die Caspase-Aktivität zeigte nach einer hypoxieinduzierten Schädigung einen signifikanten Anstieg um 60% gegenüber der Normoxie-Kontrolle (Abbildung 22). Die anschließende 24-stündige Behandlung der kortikalen Zellen mit Ifenprodil (10  $\mu$ M) verursachte keinen signifikanten Unterschied der Caspase-Aktivität gegenüber den Kontrollen (Abbildung 22).



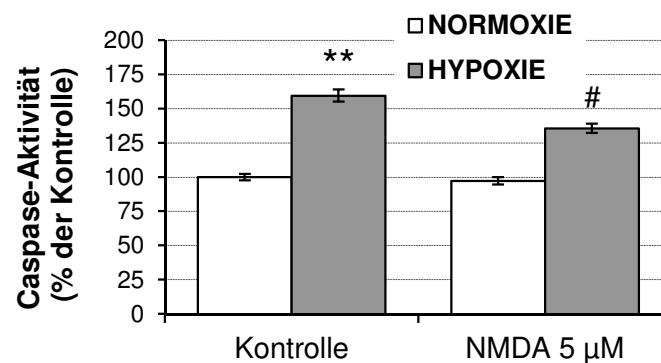
\*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle

**Abbildung 22:** Einfluss des NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil (10  $\mu$ M) auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung. Die Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 24 h in DMEM und weitere 24 h mit gepufferten Ifenprodil (10  $\mu$ M) unter normoxischen Bedingungen inkubiert. (\*p < 0,05 signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, ##p < 0,01 signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle)

### 3.3.4 Einfluss von NMDA auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung

Die Caspase-Aktivität zeigte nach hypoxiebedingter Schädigung einen signifikanten Anstieg um 60% gegenüber den Normoxie-Kontrolluntersuchungen (Abbildung 23). Um den Einfluss von NMDA ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) auf die durch die 4-stündige Hypoxie hervorgerufene Nekrose zu untersuchen, wurden die kortikalen Zellen im Anschluss daran für 24 h in DMEM und weitere 24 h lang mit NMDA ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

Der NMDA-Rezeptoragonist übte einen signifikanten Einfluss auf die Caspase-Aktivität aus, er induziert eine Hemmung der Aktivität gegenüber der Hypoxie-Kontrolle um 24% (Abbildung 23). Gegenüber der Normoxie-Kontrolle war kein signifikanter Unterschied der Caspase-Aktivität nachweisbar (Abbildung 23).



\*p < 0,05 vs. Kontrolle, \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle

**Abbildung 23:** Einfluss des NMDA-Rezeptoragonisten NMDA ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) auf die Caspase-Aktivität nach hypoxiebedingter Schädigung. Die Zellen wurden nach 4-stündiger Hypoxie für 24 h in DMEM und anschließend 24 h lang mit gepufferten NMDA ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) unter normoxischen Bedingungen inkubiert. (\*p < 0,05 signifikant gegen Normoxie-Kontrolle, #p < 0,01 signifikant gegen Hypoxie-Kontrolle)



## 4 Diskussion

Der Schlaganfall beruht auf einer zerebralen Hypoxie und ist eine der häufigsten Ursachen für neurodegenerative Erkrankungen (Fink, 2005). Er liegt in der Todesursachenstatistik auf dem dritten Platz (Fink, 2005). In den 90er Jahren wurden bereits viele Neuroprotektiva mit diversen Wirkmechanismen bis klinischen Phase-III-Studien entwickelt (Fink, 2005), doch ist bis heute noch keine evidenzbasierte Empfehlung für eine neuroprotektive Pharmakotherapie nach einem hypoxischen Hirninfarkt ausgesprochen worden (Fink, 2005).

NMDA-Rezeptorantagonisten sind die wichtigsten Membranrezeptoren und verantwortlich für die Unterdrückung der hypoxieinduzierten Zellschädigung (Garcia de Arriba et al., 2006). Sie senken den Zelltod und verbessern das Ergebnis bei Tierversuchen mit traumatischen Hirnverletzungen (Biegon et al., 2004). Auch wenn NMDA-Rezeptorantagonisten, wie CGS, in In-vitro-Schlaganfall-Tiermodellen protektiv wirkten (Gotti et al., 1990), konnte dies bisher nicht in klinischen Studien an Schlaganfall-Patienten nachgewiesen werden (Davis et al., 2000).

Die Gründe für die mangelnde Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse auf den Patienten liegen wahrscheinlich an der nur bedingten Übereinstimmung der Pharmakokinetik im Menschen mit der im Tier (Ley und Herdegen, 2004) und vor allem an der Inhomogenität der Schlaganfälle zwischen Patienten und jungen, gesunden Tiergruppen in der präklinischen Forschung (Fink, 2005).

Trotzdem ergeben sich berechtigte Hoffnungen auf neuroprotektive Pharmakotherapien in der Zukunft, da in den letzten Jahren die pathophysiologischen Abläufe während der Hypoxie und der anschließenden Erholungsphase (Reoxygenierung) genauer erforscht wurden und somit heute besser verstanden werden (Fink, Apothekenmagazin, 2005).

Auch wenn der nicht-kompetitive NMDA-Rezeptorantagonist Memantin bisher keine Wirkung in der Therapie des Schlaganfalls gezeigt hat (Davis et al., 2000), ist er bereits in den USA und Deutschland als neuroprotektive Therapie zur Verbesserung der Kognition bei Alzheimer-Demenz zugelassen (zulassungsrelevante Studien: Reisberg et al., 2003; Winblad und Poritis, 1999).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Substanzen auf das Ausmaß einer hypoxiebedingten Schädigung bei 15 Tage alten kortikalen Rattenzellen untersucht.

In unserem Modell wurden die Zellen nach einer 4-stündigen Hypoxie für 48 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert, 24 h lang im Zellkulturmedium DMEM und für weitere 24 h mit gepufferten Lösungen der unten genannten Substanzen inkubiert.

Die Hypoxie induzierte eine Zellmembranschädigung und führte zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität, einer signifikanten Freisetzung freier Sauerstoffradikale und zu einer signifikanten Steigerung der Caspase-3-Aktivität. Der signifikante Anstieg der proteolytischen Caspase-Aktivität ist dabei als wichtiges Zeichen der apoptotischen Schädigung besonders hervorzuheben.

#### **MK-801 (50 $\mu$ M)**

MK 801, ein selektiver, nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors, konnte die durch die Hypoxie hervorgerufene Schädigung der Zellmembran vermindern und führte zu einer signifikanten Abnahme der LDH-Aktivität.

#### **CGS (10 $\mu$ M)**

CGS, ein kompetitiver Antagonist an der Glutamatbindungsstelle des NMDA-Rezeptors, führte zu keiner signifikanten Progression der hypoxiebedingten Zellschädigung und der damit verbundenen Abnahme der LDH-Aktivität.

#### **Ifenprodil (10 $\mu$ M)**

Ifenprodil ist ein selektiver, nicht-kompetitiver Antagonist der Untergruppe NR2 des NMDA-Rezeptors. Er konnte den weiteren Anstieg der durch die Hypoxie verursachten Schädigung an der kortikalen Zelle nicht verhindern, sondern verursachte sogar eine signifikante Zunahme der LDH-Aktivität und, im geringeren Maße, eine Zunahme der Caspase-3-Aktivität.

Nur die Bildung der freien Sauerstoffradikale nach der hypoxieinduzierten Schädigung der kortikalen Zellen konnte durch die Behandlung mit Ifenprodil signifikant verringert werden.

#### **Memantin (0,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M und 50 $\mu$ M)**

Memantin ist ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist mit einer niedrigen Affinität zum Rezeptor (Lipton, 2004).

Bei der 24-stündigen Behandlung der kortikalen Zellen verhinderte Memantin ein weiteres Fortschreiten der durch die Hypoxie bedingten Apoptose und Nekrose der Zellen. Memantin führte in niedriger Konzentration, sowohl bei 0,5 sowie bei 5  $\mu$ M, zu einer signifikanten

Abnahme der LDH-Aktivität, zu einer verminderten Bildung freier Sauerstoffradikale und zu einer signifikanten Verminderung der Caspase-3-Aktivität.

### **NMDA (5 $\mu$ M)**

Gegenüber den Antagonisten konnte NMDA selbst durch eine subtoxische Aktivierung des Rezeptors die hypoxiebedingte Schädigung der kortikalen Zellen signifikant vermindern und zeigte außerdem eine starke neuroprotektive Wirkung auf die hypoxieinduzierte Zellschädigung, indem es signifikant die LDH-Aktivität, die Bildung freier Sauerstoffradikale und die Caspase-3-Aktivität senkte.

### **Roscovitin**

Zusammengefasst zeigen unsere Experimente eine deutliche neuroprotektive Wirkung der Substanzen Memantin in geringen Konzentrationen (0,5 und 5  $\mu$ M) und NMDA (5  $\mu$ M) sowohl bei nekrotischem als auch bei apoptotischem Zelltod.

Im physiologischen Ruhezustand der Zelle ist der Calciumkanal des NMDA-Rezeptors durch Magnesiumionen blockiert. Kommt es zu einem Signal, wird der Rezeptor durch eine ausreichende Glutamatmenge aktiviert und die Zellmembran depolarisiert. Daraufhin verlässt das Magnesiumion seine Bindungsstelle und ermöglicht somit einen kurzfristigen, starken Einstrom von Calciumionen. Über Second-Messenger-Kaskaden wird dann die Neurotransmission weitervermittelt und das Lernsignal wahrgenommen (Merz, 2006).

Die pathologisch bedingte, kontinuierliche Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, wie zum Beispiel bei Alzheimer-Demenz, durch eine niedrige Glutamatkonzentration führt zu einer erhöhten Neuronenaktivität. Dieses „erhöhte Grundrauschen“ wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass ein wichtiges ankommendes Signal nicht wahrgenommen wird. Dies führt zu einem fortschreitenden kognitiven Funktionsverlust (Merz, 2006).

Memantin ist in den letzten Jahren als NMDA-Rezeptorantagonist anerkannt worden, welcher von Menschen gut vertragen wird, zu Dosen, die vermeintlich neuroprotektiv gegenüber exzitatorischen Neurodegenerationen sind (Creeley et al., 2006).

Memantin blockiert die Calciumkanäle aufgrund seiner spezifischen Affinität zum NMDA-Rezeptor. Im Gegensatz zu Magnesiumionen blockiert Memantin jedoch diese Kanäle auch bei einer chronisch erhöhten Glutamatkonzentration und gibt sie aber, wegen seiner Spannungsabhängigkeit und schnellen Rezeptorkinetik, beim Eintreffen eines relevanten physiologischen Signals wieder frei (Merz, 2006).

Die Hemmung der glutamatergen Transmission (NMDA- und AMPA-rezeptorvermittelt) durch Memantin verbessert die Symptomatik und verzögert ebenfalls die Progression von neurodegenerativen Erkrankungen (Ley und Herdegen, 2004). So zeigte auch Garcia de Arriba et al. (2006) in einem Versuchsmodell an NT2-Neuronen den protektiven Effekt der NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin und CGS. Beide Rezeptorantagonisten verhinderten in diesem Modell die hypoxieinduzierte Nekrose der Zellen. Die Blockade der NMDA-Rezeptoraktivität beugt dem Ausmaß der auf die Nekrose und Apoptose bezogenen Exzitotoxizität vor. Memantin hat in Versuchen gezeigt, dass es nur die exzessive und nicht die physiologische NMDA-Rezeptoraktivität blockt (Lipton, 2004).

Der NMDA-Rezeptor ist aus sieben Untereinheiten zusammengesetzt: der essenziellen NR1 und den regulatorischen NR2A-D- und den NR3A-B-Untereinheiten. Diese Untereinheiten tragen an homologer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalstelle ein Asparagin (N), welches beim NR1 für die hohe Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und den spannungsabhängigen  $\text{Mg}^{2+}$ -Block verantwortlich ist (Seeberg et al., 2006). Die Regulation der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors wurde auf eine Reaktion, durch exzessive Aktivierung des Rezeptors, hin untersucht. In kultivierten kortikalen Zellen wurde ein spezifischer Rückgang der NR1-Proteinexpression durch eine Stimulierung mit NMDA erreicht. Durch den NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil wurde diese Niederregulation jedoch gehemmt (Gascon et al., 2005).

Wie in unserem Versuchsmodell sahen Zhu et al. (2005) die Möglichkeit für eine verbesserte Neuroprotektion bei der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren durch eine subtoxische Konzentration von NMDA, dessen Aktivierung das neuronale Überleben durch Verhinderung der Apoptose fördern könnte.

Die kurze Exposition von NMDA (24 h, 100  $\mu\text{M}$ ) auf unreife zerebelläre Granulazellkulturen führte zu einem dauerhaften neuroprotektiven Effekt, welcher sich auf die Hemmung der Caspase-3-Aktivität bezieht (Xifro et al., 2005).

Auch die Vorbehandlung von differenzierten neuroblastischen SH-SY5Y-Zellen mit NMDA (100  $\mu\text{M}$ ) zeigte eine Neuroprotektion; die biochemischen Analysen brachten einen signifikanten Anstieg der Aktivität von Glutathionperoxidase und der Katalase CuZnSOD zum Vorschein. Dagegen wurden die Aktivitätssteigerungen bei den vorbehandelten Kulturen mit dem nicht kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 blockiert und somit der neuroprotektive Effekt verhindert (Singh und Kaur, 2005).

Ogita et al. (2003) erforschten in vivo die Effekte, bei Vorbehandlung mit NMDA, auf den kainatinduzierten neuronalen Zelltod am Hippocampus der Mäuse. Die Ergebnisse zeigten,

dass eine In-vivo-Stimulation von NMDA-Rezeptoren, mittels NMDA, gegen eine kainat-induzierte neuronale Schädigung, durch eine Abschaffung von DNA-Fragmentierung im hippocampalen Areal CA1 und CA3, schützt. Diese Neuroprotektion wiederum wurde aber durch den nicht kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 verhindert (Ogita et al., 2003).

Die NMDA-Rezeptoraktivität, in einer subtoxischen Konzentration von 100  $\mu$ M, fördert das neuronale Überleben gegenüber einer glutamatvermittelten Exzitotoxizität mittels eines aus dem Hirn stammenden, neuronalen Wachstumsfaktors (BDNF = brain-derived neurotrophic factor). Die neuroprotektive Konzentration von NMDA steigert den Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>, senkt den Bax-mRNA-Gehalt, fördert die Synthese von BDNF und verhindert somit die Apoptose der Zellen (Zhu et al., 2005). So hat auch Favaron (1993) bereits beschrieben, dass NMDA die Expression von BDNF in kultivierten zerebellären Granulaneuronen stimuliert, was bedeutet, dass eine nicht toxische Konzentration von NMDA in einem anhaltenden Anstieg der Expression von BDNF mRNA resultiert und die neuronale Resistenz gegen die Schädlichkeit von Glutamat fördert. Der Mechanismus, verantwortlich für die NMDA-vermittelte Hochregulation von BDNF und Neuroprotektion, könnte wichtig sein in der ausgleichenden Reaktion des Hirns auf die Exzitotoxizität (Favaron et al., 1993).

Im Zusammenhang mit den Informationen aus anderen Publikationen (Xifro et al., 2005; Singh und Kaur, 2005; Zhu et al., 2005; Ogita et al., 2003) beruht der neuroprotektive Mechanismus von NMDA, den wir hier aufzeigen, auf der Hemmung der Caspase-Aktivität und der Stimulation von antioxidativen Enzymen. Wir vermuten einen trophischen Effekt von NMDA auf das Überleben der kortikalen Neurone.

Diese Arbeit zeigt, dass die Applikation niedriger NMDA-Konzentrationen neuroprotektive Effekte auf die Entwicklung der hypoxischen Schädigung von Zellmembranen hat. Dieser schützende Mechanismus von NMDA scheint denselben, wenn nicht sogar einen größeren Effekt wie Memantin aufzuweisen.

Auf der anderen Seite spielen die CDKs eine wichtige Rolle im Zellzyklus (Malumbres und Barbacid, 2001), der neuronalen Zellphysiologie (Cruz und Tsai, 2004), Apoptose (Borgne und Golsteyn, 2003) und Transkription (Garriga und Grana, 2004). Auffälligkeiten in der CDK-Aktivität und Regulation bei Tumorerkrankungen (Malumbres et al., 2000), viralen Infekten (Schang, 2004), neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer (Tsai, Lee und Cruz, 2004) und Parkinson (Smith et al., 2004), und bei Hypoxien (Wang et al., 2003) fördern die Suche nach einem selektiven Inhibitor dieser Kinase. (R)-Roscovitin ist einer der am

intensivsten untersuchten CDK-Inhibitoren (Bach et al., 2005). Die neurodegenerativen Eigenschaften von Roscovitin konnten anhand zweier Mechanismen erklärt werden: Verhinderung der Zellzyklusaktivität und der Inhibition der proapoptotischen Eigenschaften von p25 (Dai und Grant, 2003; Fischer und Gianella-Borradori, 2003; Sausville, 2002; O'Hare et al., 2002).

Unsere Ergebnisse von Roscovitin stimmen mit den bisherigen Veröffentlichungen überein: Auch in unseren Versuchen konnte Roscovitin die hypoxieinduzierte Zellmembranschädigung mindern und führte zu einer signifikanten Reduzierung der LDH-Konzentration in den kortikalen Zellen.

Insgesamt sprechen die Versuchsergebnisse für eine neuroprotektive Wirkung von NMDA auf die Entwicklung der hypoxischen Schädigung sowie für einen trophischen Effekt auf das Überleben der kortikalen Neuronen bei Ratten. Es sind jedoch weitergehende Untersuchungen besonders als In-vivo-Modelle notwendig, um festzustellen, ob NMDA für die Behandlung von zum Beispiel Alzheimer in Frage kommt. Bis heute ist jedoch Memantin als NMDA-Antagonist immer noch das Medikament der Wahl bei mittelschwerer Demenz (S3-Leitlinie „Demenzen“ 2009).

## 5 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

**Titel:** Die neuroprotektive Wirkung der NMDA-Rezeptorantagonisten CGS, Memantin und Ifenprodil, sowie Roscovitin und NMDA auf die hypoxiebedingte Zellschädigung an embryonalen kortikalen Zellen von Ratten

**eingereicht von:** Johanna Verena Gisela Holtkamp, geb. von Puttkamer

**angefertigt am:** Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
an der Universität Leipzig

**betreut von:** Prof. Dr. Clemens Allgaier  
Dr. Susana Garcia de Arriba  
Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie,  
Universität Leipzig

**Monat und Jahr:** April 2014

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der NMDA-Rezeptorantagonisten, Memantin, MK-801, CGS und Ifenprodil auf die hypoxieinduzierte Zellschädigung an kortikalen Zellen der Ratte. Außerdem wurde der Einfluss von subtoxischen Konzentrationen von NMDA sowie von Roscovitin, einem Hemmer Cyclin-abhängiger Kinasen, auf die hypoxiebedingte Zellschädigung untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, die neuroprotektive Wirkung dieser Substanzen zu erfassen.

Zur Untersuchung der hypoxischen Schädigung wurden zwei 48-Well-Zellkulturplatten mit 15 Tage alten kortikalen Zellen der Ratte verwendet. Eine Kulturplatte wurde für vier Stunden mit HEPES(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure)-Puffer (ohne Glucose)

unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Die zweite Platte, mit glukorisiertem HEPES-Puffer, wurde für vier Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Der HEPES-Puffer wurde nach vier Stunden entfernt, die Kulturplatten mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gewaschen und mit diesem Medium für 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, durch NMDA, Memantin, Roscovitin, CGS und Ifenprodil ersetzt und die Ansätze für weitere 24 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

Zur Beurteilung der Zellschädigung wurden der Aktivitätsanstieg der Laktat-Dehydrogenase (LDH), die Freisetzung freier Sauerstoffradikale und die Steigerung der Caspase-Aktivität bestimmt. Während die Bestimmung der LDH-Aktivität und die Freisetzung der freien Sauerstoffradikale nekrotische Veränderungen der Zellen charakterisiert, zeigt eine Zunahme der Caspase-Aktivität apoptotische Vorgänge an.

LDH ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das in fast allen Körperzellen vorkommt. Beim Absterben der Zelle wird das Enzym durch die Schädigung der Plasmamembran aus der Zelle freigesetzt, so dass es zu einem Anstieg der LDH-Aktivität proportional zur Anzahl der toten Zellen kommt. Diese Aktivität wurde spektrophotometrisch mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. Die Ergebnisse des LDH-Tests zeigen, dass nach der 24-stündigen Behandlung der Zellen mit MK-801 die LDH-Aktivität um 11%, bei Roscovitin um 13%, bei Memantin (5  $\mu$ M) um 56%, bei Memantin (0,5  $\mu$ M) um 52% und mit NMDA (5  $\mu$ M) um 44% signifikant vermindert wurde.

Bei einer hypoxiebedingten Schädigung kortikaler Zellen kommt es auch zur Bildung freier Sauerstoffradikale. 2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat (2',7'-H<sub>2</sub>DCF-DA) wird von den Zellen aufgenommen und intrazellulär mit Sauerstoff- und Stickstoffspezies zum Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) deacetyliert. DCF verbleibt dabei in den Zellen, so dass die Messung der Fluoreszenz der Zellen als Maß für intrazelluläre Oxidationsprozesse verwendet werden kann. Die DCF-Fluoreszenz-Änderung wurde mittels eines Fluorimeters gemessen und die daraus resultierenden Daten mit einer im Fluorimeter integrierten Software bearbeitet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Freisetzung der freien Sauerstoffradikale, der hypoxiegeschädigten Zellen, signifikant durch Ifenprodil (10  $\mu$ M) um 119%, Memantin (50  $\mu$ M) um 88% und NMDA (5  $\mu$ M) um 134% reduziert wurde.

Die hypoxieinduzierte Zellmembranschädigung führt desweiteren zu einem Anstieg der Caspase-Aktivität. Mit Hilfe des Apo-One® Homogeneous Caspase-3/7-Assays (Promega) wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 fluorimetrisch bestimmt. Um die unterschiedliche



Zelldichte in den Kulturschalen zu berücksichtigen, wurde eine Proteinbestimmung nach der Bicinchoninsäure-Methode (Smith et al. 1985) durchgeführt.

Einen protektiven Effekt auf die Zellschädigung zeigen Memantin und NMDA in Bezug auf die Beeinflussung dieser Caspase-Aktivität. Der hypoxiebedingte Anstieg der Caspase-3-Aktivität konnte nach 24-stündiger Inkubation mit Memantin (5  $\mu$ M) um 24%, mit Memantin (0,5  $\mu$ M) um 28% und mit NMDA (5  $\mu$ M) um 24% vermindert werden.

CGS hat in diesen Versuchen keinen protektiven Einfluss auf die hypoxieinduzierte Zellschädigung.

Diese Arbeit zeigt, dass die Applikation niedriger NMDA-Konzentrationen neuroprotektive Effekte auf die Entwicklung der hypoxischen Schädigung von kortikalen Zellen der Ratte hat. Darüber hinaus wird vermutet, dass NMDA sogar einen trophischen Effekt auf das Überleben der kortikalen Neurone ausübt. Dieser schützende Mechanismus von NMDA scheint denselben, wenn nicht sogar einen größeren protektiven Effekt wie Memantin zu induzieren.

Um die Therapiemöglichkeiten der zerebralen Hypoxie durch neuroprotektive Medikamente zu optimieren, wären jedoch weitergehende Untersuchungen besonders als In-vivo-Modelle wünschenswert.

## 6 Literatur

- Alnemri ES (1997) Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 64: 33-42
- Alvarez A, Muñoz JP, Maccioni RB. A Cdk5–p35 Stable Complex Is Involved in the  $\beta$ -Amyloid-Induced Deregulation of Cdk5 Activity in Hippocampal Neurons. *Experimental Cell Research*. 264 (2) 266–274.
- Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O et al. (2005) Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem* 280: 31208-19
- Biegon A, Fry PA, Paden CM et al. (2004) Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5117-22
- Borgne A, Golsteyn RM (2003) The role of cyclin-dependent kinases in apoptosis. *Prog Cell Cycle Res, France* 5: 453-459
- Canudas AM, Jordà EG, Verdaguer E, Jiménez A, Sureda FX, Rimbau V, Camins A, Pallàs M. Cyclosporin A enhances colchicine-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Br J Pharmacol*. 2004 Feb;141(4):661-9.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634
- Church J, Fletcher EJ, Baxter K, MacDonald JF (1994) Blockade by ifenprodil of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in rat and mouse cultured hippocampal pyramidal neurones: comparison with N-methyl-D-aspartate receptor antagonist actions. *Br J Pharmacol* 113: 499-507
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S and Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15: 6498-6508
- Creeley C, Wozniak DF, Labruyere J, Taylor GT, Olney JW (2006) Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci* 26: 3923-32

- Cruz JC, Tsai LH (2004) A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 14: 390-394
- Dai Y, Grant S (2003) Cyclin-dependent kinase inhibitors, *Curr Opin Pharmacol* 3: 362
- Davis SM, Lees KR, Albers GW et al. (2000) Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke* 31: 347-54
- De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L et al. (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 224: 771-786
- De la Motte S, Gianella-Borradori A (2004) Pharmacokinetic model of R-roscovitine and its metabolite in healthy male subjects. *Int J Clin Pharm Ther* 42: 232-239
- Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN) und Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) (2009) S3-Leitlinie „Demenzen“. 50-53
- Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Oct;2(10):749-59.
- Doraiswamy P (2002) Memantine: An update. *The Caregiver* 21: 7-8
- Favaron M, Manev RM, Rimland JM et al. (1993) NMDA-stimulated expression of BDNF mRNA in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroreport* 4: 1171-4
- Fink KB (2005) Pharmakotherapie und -prophylaxe des Schlaganfalls. *Apothekenmagazin* 23: 200-7
- Fischer PM, Gianella-Borradori A (2003) CDK inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 955
- Ganten D, Ruckpaul K (2008) *Grundlagen der Molekularen Medizin*, 3. Auflage Springer Medizin Verlag Heidelberg. 162-175, 200
- Garcia de Arriba S, Wegner F, Grüner K et al. (2006) Different capacities of various NMDA receptor antagonists to prevent ischemia-induced neurodegeneration in human cultured NT2 neurons. *Neurochemistry Int* 1847: 1-9
- Garriga J, Grana X (2004) Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* 337: 15-23

- Gascón S, Deogracias R, Sobrado M et al. (2005) Transcription of the NR1 subunit of the N Methyl-D-Aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *J Biol Chem* 280: 35018-27
- Gotti B, Benavides J, MacKenzie ET, Scatton B (1990) The pharmacotherapy of focal cortical ischaemia in the mouse. *Brain Res* 522: 290-307
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E et al. (2008) Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359: 1317-1329
- Herold, G. und Mitarbeiter (2006) *Innere Medizin*, Köln: 696-700
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J (1996) The glycine binding site of the N-methyl D-aspartate receptor subunit NR1: Identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6031-6
- Hofmann E. (1999) *Medizinische Biochemie systematisch*, UNI-MED, Bremen, 139-144
- Hollmann M und Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Ann Rev Neurosci* 17: 31-108
- Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD (2004) The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med* 4: 131-6
- Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Bruck W, Hortnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci*. 2001 Jul 15;21(14):5045-53.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26: 239–257
- Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12: 1291-300

- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18: 493-503
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*. 2000 May 18;405(6784):360-4.
- Ley L und Herdegen T (2004) Neuroprotektive Therapien für neurodegenerative Erkrankungen. *Arzneimitteltherapie* 22: 328-335
- Lipton SA (2004) Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 1(1): 101-10
- Lovinger DM (1995) Developmental decrease in ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rat neocortical neurons: relation to the actions of ifenprodil. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 164-72
- Malumbres M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 222-31
- Malumbres M, Ortega S, Barbacid M (2000) Genetic analysis of mammalian cyclin dependent kinases and their inhibitors. *Biol Chem* 381: 827-838
- Menn B, Bach S, Blevins TL, Campbell M, Meijer L, Timsit S. Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models. *PLoS One*. 2010 Aug 12;5(8):e12117.
- Merz (2006) Quelle: Die Signal/Rausch-Hypothese. Online im Internet; URL: [http://www.memantine.com/de/studien/paeklinische\\_daten/signal-rausch-hypothese/](http://www.memantine.com/de/studien/paeklinische_daten/signal-rausch-hypothese/)
- Müller WE, Mutschler E, Riederer P (1995) Noncompetitive NMDA receptor antagonists with fast open-channel blocking kinetics and strong voltage-dependency as potential therapeutic agents for Alzheimer's dementia. *Pharmacopsychiatry* 28: 113-124
- Nath R, Davis M, Probert AW, Kupina NC, Ren X, Schielke GP, Wang KK. Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 21;274(1):16-21.

- O'Hare M., Wang F, Park DS (2002) Cyclin-dependent kinases as potential targets to improve stroke outcome. *Pharmacol Ther* 93: 135-43
- Ogita K, Okuda H, Yamamoto Y et al. (2003) In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *J Neurochem* 85: 1336-46
- Patzke H, Tsai LH. Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8054-60.
- Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, Paoletti P (2002) Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* 22: 5955-65
- Reisberg B, Doody R, Stöffler A et al. (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 1333-41
- Ringleb P, Schellinger P, Hacke W (2001) Schlaganfalltherapie aus neurologischer Sicht. Das Zeitfenster für die Lyse ist enger als beim Herzinfarkt. *Cardiovasc* 1: 12
- Sausville EA (2002) Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends Mol Med* 8: 32
- Schang LM (2004) Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. *Biochim Biophys Acta* 1697: 197-209
- Schwedt G (1981) *Fluorimetrische Analyse, Methoden und Anwendungen*. Verlag Chemie, 1-83
- Seeburg PH, Sprengel R, Köhr G, Osten P (2006) Genetisch veränderte Glutamaterezeptoren in der Maus: Synaptische Erregungsleitung, Plastizität und Rolle beim Lernen. Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg
- Singh J, Kaur G (2005) Neuroprotection mediated by subtoxic dose of NMDA in SH-SY5Y neuroblastoma cultures: Activity-dependent regulation of PSA-NCAM expression. *Mol Brain Res* 137: 223-34
- Smith PK, Fujimoto EK, Gartner FH, Goeke NM et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85

- Trujillo KA, Akil H (1995) Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. *Drug Alcohol Depend* 38: 139-54
- Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A et al. (2008) Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet* 372: 1303-9
- Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci.* 2003 Oct;6(10):1039-47.
- Weishaupt JH, Kussmaul L, Grötsch P, Heckel A, Rohde G, Romig H, Bähr M, Gillardon F. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Oct;24(2):489-502. Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction
- Winblad B, Poritis N (1999) Memantine bei schwerer Demenz. *Int J Geriatr Psych* 14: 135-46
- Xifro X, Malagelada C, Minano A et al. (2005) Brief exposure to NMDA produces long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *Eur J Neurosci* 21: 827-40
- Zhu D, Wu X, Strauss KI et al. (2005) N-Methyl-D-Aspartate and TrkB receptors protect neurons against glutamate excitotoxicity through an extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Neurosci Res* 80: 104-13

## **7 Anhang**

### **7.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Osnabrück, den 10.04.2014

---

Johanna Verena Gisela Holtkamp



## 7.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name:	Johanna Verena Gisela Holtkamp
Geburtsname:	von Puttkamer
Straße:	Weißenburger Str. 8
Wohnort:	49076 Osnabrück
Telefon:	0541/4099411 oder 0172/5433026
E-Mail:	johanna.holtkamp@web.de
Geburtsdatum:	26.05.1981
Familienstand:	verheiratet, ein Kind

### Ausbildung/beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang

---

06/2000	Abitur an der Sophienschule Hannover
12/2000 - 11/2008	Humanmedizinstudium an der Universität Leipzig
09/2004	1. Ärztliche Prüfung (Physikum)
05/2005 - 05/2006	Beginn der wissenschaftlichen Arbeit für die Dissertation am Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter Leitung von Prof. Dr. C. Allgaier
12/2008	2.Ärztliche Prüfung (Hammerexamen)
Seit 02/2009	Assistenzärztin, Klinik der Inneren Medizin / Kardiologie, Angiologie und Nephrologie im Marienhospital in Osnabrück
Seit 10/2012	Elternzeit

Osnabrück, den 10.04.2014

---

Johanna Verena Gisela Holtkamp

### **7.3 Danksagung**

Zu Beginn möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. C. Allgaier für das Überlassen des Themas dieser Dissertation sowie für die freundliche Betreuung bedanken. Desweiteren danke ich Frau Dr. S. Garcia de Arriba für ihre zahlreichen Hinweise und Ratschläge bei der Bearbeitung des Themas. Ihre wertvollen Anregungen habe ich immer sehr geschätzt. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen sowie für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Zuletzt gilt mein spezieller Dank meiner Mutter und meinem Ehemann für ihre konstante, geduldige Zusprache bis zur Vervollständigung dieser Arbeit.